



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

TATIANA FERRARI BALDINI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ARAÇÁ-BOI (*EUGENIA  
STIPITATA*) LIOFILIZADO E DO NÉCTAR DE MAÇÃ SUPLEMENTADO COM O  
MESMO

CAMPINAS  
2016

**TATIANA FERRARI BALDINI**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ARAÇÁ-BOI (*EUGENIA STIPITATA*) LIOFILIZADO E DO NÉCTAR DE MAÇÃ SUPLEMENTADO COM O MESMO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos/Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos

Supervisor/Orientador: JULIANO LEMOS BICAS

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA TATIANA  
FERRARI BALDINI, E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. JULIANO LEMOS  
BICAS

CAMPINAS

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 403153/2013-1; CAPES

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

B193a Baldini, Tatiana Ferrari, 1985-  
Avaliação do potencial antioxidante do araçá-boi (*Eugenia stipitata*) liofilizado e do néctar de maçã suplementado com o mesmo / Tatiana Ferrari Baldini. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Juliano Lemos Bicas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Compostos fenólicos. 2. Flavonoides. 3. Frutas exóticas. 4. Capacidade antioxidante. 5. Alimentos funcionais. I. Bicas, Juliano Lemos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the antioxidant potential of lyophilized araçá-boi (*Eugenia stipitata*) and lyophilized araçá-boi enriched nectar.

**Palavras-chave em inglês:**

Phenolic compounds

Flavonoids

Exotic fruits

Antioxidant capacity

Functional foods

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Juliano Lemos Bicas [Orientador]

Solange Guidolin Caniatti Brazaca

Vera Sônia Nunes da Silva

**Data de defesa:** 15-12-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas  
Orientador  
DCA/FEA/UNICAMP

Profª. Drª. Solange Guidolin Canniatti Brazaca  
Membro Titular  
ESALQ/USP

Profª. Drª. Vera Sônia Nunes da Silva  
Membro Titular  
CCQA/ITAL

Profª. Any Elisa de Souza Schmidt Gonçalves  
Membro Suplente  
UNICAMP

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán  
Membro Suplente  
DEPAN/FEA/UNICAMP

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no  
processo de vida acadêmica do aluno.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico

Aos meus pais, José Antonio Brotto Baldini e Marinês Aparecida Ferrari Baldini, que sempre me apoiaram e torceram por mim. Ao meu marido, Carlos Cabral, que me incentivou, apoiou e auxiliou durante o mestrado.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais José Antonio e Marinês por todo amor, apoio e incentivo durante essa trajetória, por sempre terem acreditado em mim e por serem minha base e meus exemplos.

Ao meu marido Carlos por todo amor, incentivo, paciência e auxílio ao longo dessa jornada, por ter acreditado em mim e me ajudado a superar os desafios do caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas, por todos os ensinamentos, apoio e paciência. Você esteve sempre disponível e pronto para me auxiliar no que fosse preciso.

Aos membros da banca examinadora, pelo excelente trabalho de revisão e pelas sugestões. Vocês contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos, pela amizade e por todo auxílio que prestaram. Vocês foram muito importantes e me ajudaram muito nessa jornada.

À Angélica, pela disponibilidade, ensinamentos, paciência e por toda ajuda. Você foi essencial para que eu conseguisse executar esse projeto.

Ao Nadir, por todo auxílio e pelo bom humor contagiante.

Ao Márcio Schmiele, do laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos do DTA/FEA, por permitir o uso de equipamentos do laboratório e pelo auxílio prestado nas análises de composição centesimal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada!

## RESUMO

As evidências científicas dos benefícios à saúde proporcionados pelas frutas e vegetais, cada vez mais divulgadas nos meios de comunicação, impulsionam o setor industrial a recompor o *portfólio* de produtos que atendam às exigências do mercado consumidor e apontem perspectivas favoráveis para a demanda de frutas *in natura* e processadas, tanto no mercado interno quanto no externo. Por essa razão, estudos direcionados à elucidação do potencial das propriedades das frutas nativas brasileiras podem trazer subsídios para que estas ganhem importância no mercado consumidor a médio e longo prazo, além de se obter maior entendimento de suas contribuições para a melhoria da saúde humana. Ainda, a preocupação com o meio ambiente incentiva inovações tecnológicas que visem ao crescimento da oferta de produtos funcionais certificados pelos órgãos competentes, além de reforçar a relação entre pesquisa acadêmica, desenvolvimento industrial e mercado econômico. Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar as propriedades antioxidantes do araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) liofilizado (polpa e casca) para o conhecimento do seu potencial, bem como o estudo de sua aplicação como ingrediente funcional para o enriquecimento e agregação de valor a um néctar de maçã comercial. Os resultados obtidos na determinação de fenóis e flavonoides totais do araçá-boi liofilizado foram 10,01 mg EAG/100 g (base úmida) e 11,04 mg ECAT/g (base úmida), respectivamente. Na determinação da atividade antioxidante do araçá-boi liofilizado por DPPH, o valor encontrado foi de 0,931 mg ET/g (base úmida). Já na determinação por TEAC, o valor encontrado foi de 1,48 mg ET/g (base úmida). Por fim, no ensaio ORAC, o valor obtido foi de 16,46  $\mu$ mol ET/g (base úmida). O néctar de maçã comercial suplementado com 1 g/L de araçá-boi liofilizado obteve a melhor aceitação na análise sensorial, entretanto, a atividade antioxidante e o conteúdo total de fenóis não foram significativamente maiores do que os encontrados no néctar de maçã comercial. Já o néctar de maçã suplementado com 10 g/L de araçá-boi liofilizado obteve quantidade de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante significativamente maiores mantendo aceitação sem diferença estatística com relação ao controle (néctar não suplementado). Nota-se que o araçá-boi liofilizado, com seu teor de fenóis e flavonoides, conferiu aumento significativo na atividade antioxidante do néctar de maçã, na concentração de 10 g/L, sem prejudicar a aceitação do produto. Dessa forma, sugere-se que esta

fruta possa ser utilizada para melhorar perfil de fenólicos e de antioxidantes em néctar de maçã mantendo as propriedades sensoriais dos mesmos.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos, flavonoides, frutas exóticas, capacidade antioxidante, alimentos funcionais.



## ABSTRACT

Scientific evidence on the health benefits provided by fruits and vegetables, increasingly reported by the media, drive industry to rebuild its product portfolio in order to answer to consumer market's demands and point towards a positive outlook to *in natura* and processed fruit demand, as well as in internal and in external markets. For this reason, studies related to providing new insights on the potential of Brazilian native fruit properties might bring additional support for increasing the importance of them in the consumer market at medium and long term and also gaining a better knowledge of their contribution to human health improvement. Also, concerns with the environment encourages technological innovations which address the growth of functional products supply certified by competent organs. Besides that, it also reinforces the relationship with academic research, industry development and economic market. In this way, the general goal of this work is the evaluation of the antioxidant properties of lyophilized araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) (pulp and peel) in order to understand its potential and also study its applicability as a functional ingredient for the enrichment and added value for an apple commercial nectar. The results on the total phenolics and total flavonoids tests for the lyophilized araçá-boi were 10.01 mg GAE/100 g FW and 11.04 mg CAT/g FW, respectively. Regarding the antioxidant activity determination via DPPH method, the obtained result was 0.931 mg TE/g FW. For the TEAC determination, the obtained result was 1.48 mg TE/g FW. Finally, for the ORAC test, the obtained result was 16.46  $\mu$ mol TE/g FW. The apple nectar enriched with 1 g/L of lyophilized araçá-boi was the one with the best acceptance at the sensorial analysis, however, the antioxidant activity and the total phenolics were not significantly higher than the ones found on the apple nectar without enrichment. On the other hand, the apple nectar enriched with 10 g/L of lyophilized araçá-boi yielded a significant higher amount of total phenolics, total flavonoids and significant higher antioxidant activity, while still maintaining acceptance with no statistical difference when compared to the control (non-enriched apple nectar). It was noticed that the lyophilized araçá-boi, with its phenolic and flavonoid contents, with the 10 g/L concentration, contributed to a significant increase on the antioxidant activity of the apple nectar without compromising the product's acceptance. Therefore, it is suggested that this fruit can be utilized to enhance the

phenolic and antioxidant profile in apple nectar without interfering on its sensorial properties.

**Keywords:** Phenolic compounds, flavonoids, exotic fruits, antioxidant capacity, functional foods.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tipos de antioxidantes.....	21
<b>Figura 2.</b> Estrutura geral dos flavonoides.....	24
<b>Figura 3.</b> Exemplos de cada tipo de flavonoide: flavonóis (quercetina), favanóis (epicatequina), antocianidinas (cianidina), flavanonas (naringenina), flavonas (apigenina) e isoflavonoides (genisteína).....	25
<b>Figura 4.</b> Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	32
<b>Figura 5.</b> Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante envolvendo a transferência de um átomo de hidrogênio.....	33
<b>Figura 6.</b> Reação do ácido gálico com o molibdênio do reagente de Folin-Ciocalteu.....	36
<b>Figura 7.</b> Complexação do flavonóide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl <sub>3</sub> ) o qual forma o complexo estável flavonóide-Al <sup>3+</sup> .....	37
<b>Figura 8.</b> Frutos de araçá-boi ( <i>Eugenia stipitata</i> McVaugh).....	39
<b>Figura 9.</b> Amostras apresentadas para os consumidores no Teste de Comparação Múltipla. Da direita para a esquerda: néctar sem suplementação, néctar suplementado com 5 g/L de AL, néctar suplementado com 10 g/L de AL e néctar suplementado com 20 g/L de AL.....	57
<b>Figura 10.</b> Gráfico da Intenção de compra.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classes principais de compostos fenólicos.....	23
<b>Tabela 2.</b> Métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante de compostos alimentares.....	30
<b>Tabela 3.</b> Comparação entre néctar de maçã puro (1) e néctar de maçã suplementado com 5 g/L (2), 10 g/L (3) e 20 g/L (4) de AL. As análises estatísticas foram feitas por ANOVA e Teste de DUNNETT.....	58
<b>Tabela 4.</b> Médias de aceitação de consumidores em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global das amostras - ANOVA e Teste de Médias de Tukey.....	59
<b>Tabela 5.</b> Origem dos frutos de araçá-boi dos estudos utilizados para comparação.....	61
<b>Tabela 6.</b> Composição centesimal do araçá-boi.....	62
<b>Tabela 7.</b> Valores de pH do néctar, do néctar enriquecido com o AL nas diferentes concentrações e do AL reconstituído.....	63
<b>Tabela 8.</b> Valores da acidez total titulável determinados para o néctar, néctar enriquecido com AL nas diferentes concentrações e AL reconstituído.....	65
<b>Tabela 9.</b> Valores de sólidos solúveis totais determinados para o néctar, néctar enriquecido com AL nas diferentes concentrações e AL reconstituído.....	66
<b>Tabela 10.</b> Valores de concentração de vitamina C determinados para o néctar e para o AL reconstituído e calculado para os néctares suplementados com AL.....	69
<b>Tabela 11.</b> Resultados das análises de fenóis totais e flavonoides do néctar, do néctar enriquecido com AL nas diferentes concentrações e do AL.....	71
<b>Tabela 12.</b> Resultados das Análises de DPPH, TEAC e ORAC do néctar, do néctar suplementado com o AL nas diferentes concentrações e do AL.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAPH</b>	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), sal de diamônio
<b>AL</b>	Araçá-boi liofilizado
<b>ATT</b>	Acidez Total Titulável
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CLAE-DAD</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos
<b>CL-EM</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
<b>CLUE-ESI-EM/EM</b>	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com fonte de ionização por Eletrospray acoplada à Espectrometria de Massa Sequencial
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>DCFI</b>	2,6 diclorofenol-indofenol - sal sódico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>EAG</b>	Equivalente de Ácido Gálico
<b>ECAT</b>	Equivalente de Catequina
<b>ERE</b>	Espécies reativas de enxofre
<b>ERN</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ET</b>	Equivalente de Trolox
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>MnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente de manganês
<b>ORAC</b>	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio
<b>SST</b>	Sólidos Solúveis Totais
<b>TEAC</b>	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
<b>TRAP</b>	Parâmetro Antioxidante Total do Radical
<b>Trolox</b>	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Estresse oxidativo e antioxidantes .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Compostos fenólicos.....</b>	<b>22</b>
3.2.1. <i>Flavonoides .....</i>	<i>24</i>
<b>3.3. Determinação da Atividade Antioxidante .....</b>	<b>27</b>
3.3.1. <i>Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).....</i>	<i>31</i>
3.3.2. <i>Atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)...</i>	<i>33</i>
3.3.3. <i>Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio – ORAC.....</i>	<i>34</i>
<b>3.4. Determinação de Fenóis Totais e Flavonoides Totais .....</b>	<b>35</b>
3.4.1. <i>Ensaio de Determinação de Fenóis Totais .....</i>	<i>35</i>
3.4.2. <i>Ensaio de Determinação de Flavonoides Totais.....</i>	<i>36</i>
<b>3.5. Mirtáceas .....</b>	<b>37</b>
3.5.1. <i>Araçá-boi .....</i>	<i>38</i>
<b>3.6. Bebidas funcionais .....</b>	<b>40</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Materiais e Reagentes .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Preparo do araçá-boi liofilizado (AL).....</b>	<b>43</b>
<b>4.3. Teste de Comparação Múltipla .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4. Teste de Aceitação.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5. Determinação da composição centesimal do AL.....</b>	<b>44</b>
4.5.1. <i>Determinação da Umidade .....</i>	<i>44</i>
4.5.2. <i>Determinação de Cinzas.....</i>	<i>45</i>
4.5.3. <i>Determinação de Lipídeos .....</i>	<i>45</i>
4.5.4. <i>Determinação de Proteínas .....</i>	<i>45</i>
4.5.5. <i>Determinação de Carboidratos .....</i>	<i>46</i>
4.5.6. <i>Determinação de fibra solúvel e insolúvel.....</i>	<i>46</i>
<b>4.6. Preparo do AL reconstituído .....</b>	<b>47</b>
<b>4.7. Determinação das propriedades físico-químicas e do teor de vitamina C no néctar, AL reconstituído e néctares suplementados com AL.....</b>	<b>48</b>

4.7.1. Determinação do pH.....	48
4.7.2. Acidez Total Titulável (ATT).....	48
4.7.3. Determinação de Sólidos Solúveis Totais (SST) .....	49
4.7.4. Determinação de vitamina C.....	49
<b>4.8. Determinação de Fenóis Totais .....</b>	<b>50</b>
<b>4.9. Determinação de Flavonoides Totais .....</b>	<b>51</b>
<b>4.10. Determinação da atividade antioxidante.....</b>	<b>52</b>
4.10.1. Atividade Sequestradora do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) 52	
4.10.2. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).....	53
4.10.3. Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio (ORAC) .....	54
<b>4.11. Análises estatísticas .....</b>	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1. Teste de Comparação Múltipla .....	57
5.2. Teste de Aceitação e intenção de compra .....	58
5.3. Composição Centesimal .....	60
5.4. Determinação de pH .....	63
5.5. Determinação da Acidez Total Titulável (ATT) .....	64
5.6. Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (SST).....	65
5.7. Determinação de Vitamina C.....	67
5.8. Determinação de Fenóis Totais e Flavonoides Totais.....	69
5.9. Determinação da atividade antioxidante.....	71
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As frutas são reconhecidas fontes de vitaminas, minerais e fibras e por essa razão constituem-se alimentos nutricionalmente importantes na dieta. Nos últimos anos, entretanto, uma atenção maior tem sido dada a estes alimentos já que evidências epidemiológicas têm demonstrado que o consumo regular de frutas e vegetais está associado à redução da mortalidade e morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis. O efeito protetor exercido por estes alimentos tem sido atribuído à presença de vitaminas, minerais, fibras e fitoquímicos com ação antioxidante, destacando-se os polifenóis (MELO *et al*, 2008).

As frutas, grandes fontes dietéticas de polifenóis, apresentam, em termos quantitativos e qualitativos, composição variada desses constituintes em função de fatores intrínsecos (cultivar, variedade, estágio de maturação) e extrínsecos (condições climáticas e edáficas). Dessa forma, a eficácia da ação antioxidante depende da estrutura química e da concentração destes compostos no alimento.

As recentes descobertas no campo nutricional, relacionando os hábitos alimentares com a incidência de doenças, estão mudando os paradigmas dos consumidores e das indústrias de alimentos. Tanto no Brasil quanto no exterior multiplicam-se os fóruns de discussão a respeito das novas descobertas e usos dos alimentos funcionais. A valorização dos benefícios proporcionados pelas frutas e vegetais amparada por evidências científicas impulsionam o setor industrial a recompor o arsenal de produtos que atendam as exigências do mercado consumidor e apontem perspectivas favoráveis para a demanda de frutas *in natura* e processadas, tanto no mercado interno quanto externo (CHIARELLO, 2002; BUAIANAIN; BATALHA, 2007; JONES; JEW, 2007; IKEDA *et al.*, 2010).

Considerando o fato de que o setor de bebidas, especialmente as não alcoólicas, vem ampliando seu mercado (FORTITECH, 2013), introduzindo novos sabores e atendendo a demanda crescente por novos produtos que reflitam uma melhor qualidade de vida, o emprego de extrato de frutas nativas na produção dessas bebidas surge como um diferencial, pois agrega à bebida as vantagens inerentes ao produto e responde ao forte apelo dos consumidores por produtos naturais.



Uma das metas deste trabalho consiste em enriquecer a literatura com informações inéditas a respeito da suplementação de um néctar comercial com uma fruta amazônica pouco conhecida fora da região amazônica, o araçá-boi. O trabalho inclui a determinação de fenóis e flavonoides totais e avaliação da atividade antioxidante do araçá-boi liofilizado e do néctar suplementado com o mesmo, a fim de subsidiar tanto o consumo *in natura*, quanto a geração de um produto de valor agregado. No Brasil, os estudos desta natureza ainda são considerados incipientes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o araçá-boi liofilizado (AL) (*Eugenia stipitata* McVaugh) em termos de composição centesimal, teor de compostos fenólicos e flavonoides e propriedades antioxidantes, bem como estudar sua aplicação no desenvolvimento de néctar com apelo funcional.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Liofilizar a parte comestível (polpa e casca) dos frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata*);
- Determinar a composição centesimal do araçá-boi liofilizado (AL);
- Determinar o teor de vitamina C do néctar comercial de maçã e do AL reconstituído;
- Suplementar o néctar comercial de maçã com AL em diferentes concentrações e avaliar suas características sensoriais (Teste de Comparação Múltipla e Teste de Aceitação e Intenção de compra);
- Determinar o pH, a acidez total titulável e o teor de sólidos solúveis totais do néctar de maçã comercial, do néctar de maçã comercial suplementado com AL em diferentes concentrações e do AL reconstituído;
- Quantificar o conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides do néctar de maçã comercial, do AL e do néctar de maçã comercial suplementado em diferentes concentrações;
- Avaliar o potencial antioxidante através dos métodos DPPH, ABTS e ORAC do néctar de maçã comercial, do AL e do néctar de maçã comercial suplementado com diferentes concentrações de AL.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Estresse oxidativo e antioxidantes

Os radicais livres ou espécies reativas são átomos, moléculas ou íons que possuem elétrons desemparelhados que são altamente instáveis e prontos para reagir com outras moléculas. Eles podem derivar dos elementos oxigênio, nitrogênio e enxofre e assim formar espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERS). As ERO incluem radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), radical hidroxila (OH), óxido nítrico (NO) e outras espécies, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). As ERN derivam da reação do NO com o  $O_2^{\cdot-}$ , formando  $ONOO^-$ . As ERS são formadas facilmente pela reação das ERO com os tióis (LÜ *et al.*, 2010).

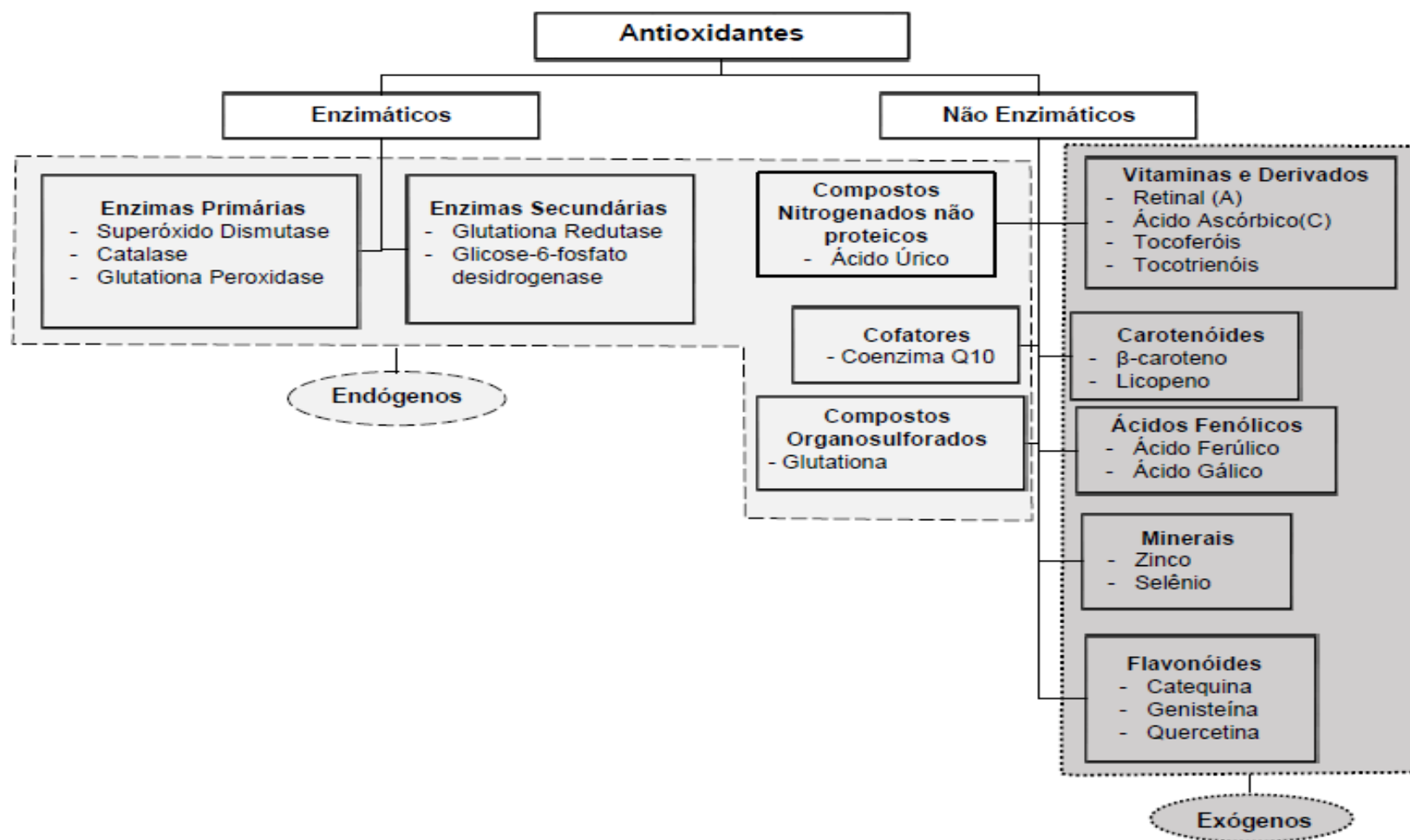
As espécies reativas são formadas continuamente durante os processos metabólicos (normais ou patogênicos) ou são ainda provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Essas espécies atuam como mediadores da transferência de elétrons em vários processos bioquímicos, como a fagocitose, fenômeno em que espécies reativas de oxigênio como  $H_2O_2$ ,  $ClO^-$  e  $^1O_2$ , são produzidas para eliminar o agente agressor por oxidação. Entretanto, quando estão presentes em concentrações acima do normal, essas espécies podem causar efeitos potencialmente importantes, tais como danos celulares e ativação de caminhos de sinalização específicos (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

O estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e a produção de compostos oxidativos está associado com diversas doenças de origem multifatorial, como os vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e Parkinson, artrite, asma, alergia e outras desordens inflamatórias. Os mecanismos pelos quais essas doenças se desenvolvem, geralmente envolvem alterações oxidativas em moléculas consideradas críticas, o que inclui proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos além das substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Em geral, o estresse oxidativo pode resultar da diminuição das defesas antioxidantes (como mutações que diminuem os níveis de defesas antioxidantes tais como GSH ou MnSOD), da depleção de antioxidantes dietéticos e outros

constituintes dietéticos essenciais (como cobre, ferro, zinco, magnésio) e da produção aumentada de espécies reativas (como pela exposição a níveis elevados de  $O_2$  e presença de toxinas que produzem espécies reativas) ou ativação excessiva de sistemas “naturais” produtores de espécies reativas (por exemplo ativação inadequada de células fagocitárias em doenças crônicas inflamatórias) (HALLYWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes (Figura 1) podem ser definidos como substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, podem retardar ou inibir a oxidação do substrato de forma significativa. Alguns antioxidantes são compostos endógenos (enzimas), enquanto outros são compostos exógenos, (algumas vitaminas e compostos fenólicos oriundos da dieta). Do ponto de vista do mecanismo antioxidante, eles podem ser classificados como antioxidantes de prevenção, antioxidantes sequestradores e antioxidantes de reparo. Os antioxidantes de prevenção agem como primeira linha de defesa suprimindo a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN), por meio da redução do peróxido de hidrogênio e dos hidroperóxidos lipídicos à água e hidróxidos lipídicos, respectivamente, ou pelo sequestro de íons metálicos, como ferro e cobre. Os antioxidantes sequestradores removem espécies oxidantes ativas rapidamente, antes que essas espécies ataquem moléculas biologicamente essenciais. Eles agem como segunda linha de defesa *in vivo*. Muitos compostos fenólicos e aminas aromáticas agem como antioxidantes sequestradores. Sendo que muitas enzimas atuam na terceira linha de defesa, reparando os danos causados pelos radicais livres e reconstituindo a função perdida. Além disso, o mecanismo de adaptação funciona como quarta linha de defesa, pela qual os antioxidantes apropriados são gerados no tempo correto e transferidos para a posição correta, na concentração correta. Existem ainda evidências de que alguns antioxidantes podem agir como mensageiros de sinalização celular para regular os níveis de compostos antioxidantes e enzimas (NIKI, 2010).



**Figura 1.** Tipos de antioxidantes (Fonte: RATNAM *et al.*, 2006).

Dentre os antioxidantes enzimáticos mais estudados destacam-se as superóxido dismutases, consideradas como a linha de frente de defesa antioxidante, embora possam exibir atividade peroxidásica (reação de redução do peróxido de hidrogênio e oxidação de um doador de elétrons (AH)) na presença de excesso de  $H_2O_2$ . Destacam-se também a catalase e as glutathionas peroxidases, encarregadas de reduzir peróxidos geradores de radicais  $\cdot OH$  e  $\cdot OR$ , respectivamente (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

Os antioxidantes de baixo peso molecular incluem algumas vitaminas, como a vitamina C, E e A, carotenoides, flavonoides, outros polifenóis, furanoides e tióis. Alguns antioxidantes de baixo peso molecular podem ser sintetizados no próprio organismo ou ser oriundos da dieta. Estão presentes em número e concentração maiores que os antioxidantes enzimáticos e distribuídos em ambientes lipofílicos e hidrofílicos (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

Os antioxidantes podem agir também como pró-oxidantes dependendo de sua concentração e da natureza das moléculas vizinhas. A controvérsia existente em torno dos antioxidantes é devido à sua capacidade de exibir comportamento antioxidante e pró-oxidante, dependendo de vários fatores. Segundo HALLIWELL (2008), os efeitos pró-oxidantes também podem ser benéficos, quando, ao impor um grau moderado de estresse oxidativo, faz com que os níveis de defesas antioxidantes aumentem, levando à proteção celular. Outros autores, como GOMES *et al.* (2003), também demonstraram que o efeito pró-oxidante dos flavonoides poderia mitigar certos tipos de câncer.

Existem diversos compostos antioxidantes presentes nos alimentos, destacando-se os compostos fenólicos, carotenoides e a vitamina C. Como este trabalho envolve o estudo dos compostos fenólicos, suas propriedades serão descritas em maiores detalhes na sequência.

### **3.2. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e são caracterizados por possuírem ao menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2006). São comumente encontrados em vegetais e frutas, os quais constituem uma porção significativa da

nossa dieta, e estão entre as substâncias bioativas mais potentes. Mais de 8.000 compostos fenólicos são conhecidos. (APAK *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila ligado ao anel aromático, o qual reduz as espécies reativas (PEREIRA *et al.*, 2012). Assim, os compostos fenólicos agem neutralizando e sequestrando radicais livres e quelando metais de transição. Os compostos intermediários formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis devido à distribuição de carga ao longo do anel aromático.

A quantificação dos compostos fenólicos em frutas e hortaliças revela informações a respeito da qualidade do alimento e dos potenciais benefícios a saúde (TALCOTT *et al.*, 2003). Segundo VASCO; RUALES, KAMAL-ELDIN (2008) e RUFINO *et al.* (2010), as frutas podem ser classificadas em três categorias quanto ao conteúdo de fenólicos totais: baixo (<100 mg EAG/100 g), médio (100-500 mg EAG/100 g) e alto (>500 mg EAG/100g) para amostras baseadas em matéria fresca.

Os compostos fenólicos podem ser divididos em algumas classes estruturais principais (Tabela 1). Na sequência serão abordadas as propriedades da classe dos flavonoides, alvo deste estudo.

**Tabela 1.** Classes principais de compostos fenólicos (APAK *et al.*, 2007).

Estrutura de Carbono	Classe	Exemplo
C <sub>6</sub>	Fenóis Simples	Resorcinol
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos Fenólicos	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas e Ácidos Fenilacético	Floroacetofenona e Ácido 2-hidróxifenilacético
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido cafeico
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Hidroxiantraquinonas	Fisciona
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	Resveratrol
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides	Quercetina
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanais	Matairesinol
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoides	Agatisflavona
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas	-
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos condensados	Procianidina

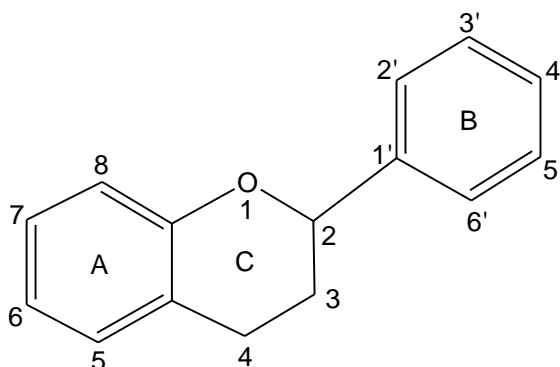
### 3.2.1. Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de metabólitos secundários no Reino Vegetal. Compreendem mais de 5.000 compostos com uma estrutura polifenólica comum e possuem funções essenciais nas plantas (MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2014). São compostos de baixo peso molecular encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, ervas, temperos, caules e flores assim como em chás e no vinho tinto (ROMANO *et al.*, 2013). Estão presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até as folhas e frutos, sendo encontrados nos vacúolos das células. Podem ser encontrados na forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos).

De acordo com as diferenças estruturais no anel heterocíclico C (Figura 2), os flavonoides podem ser classificados como:

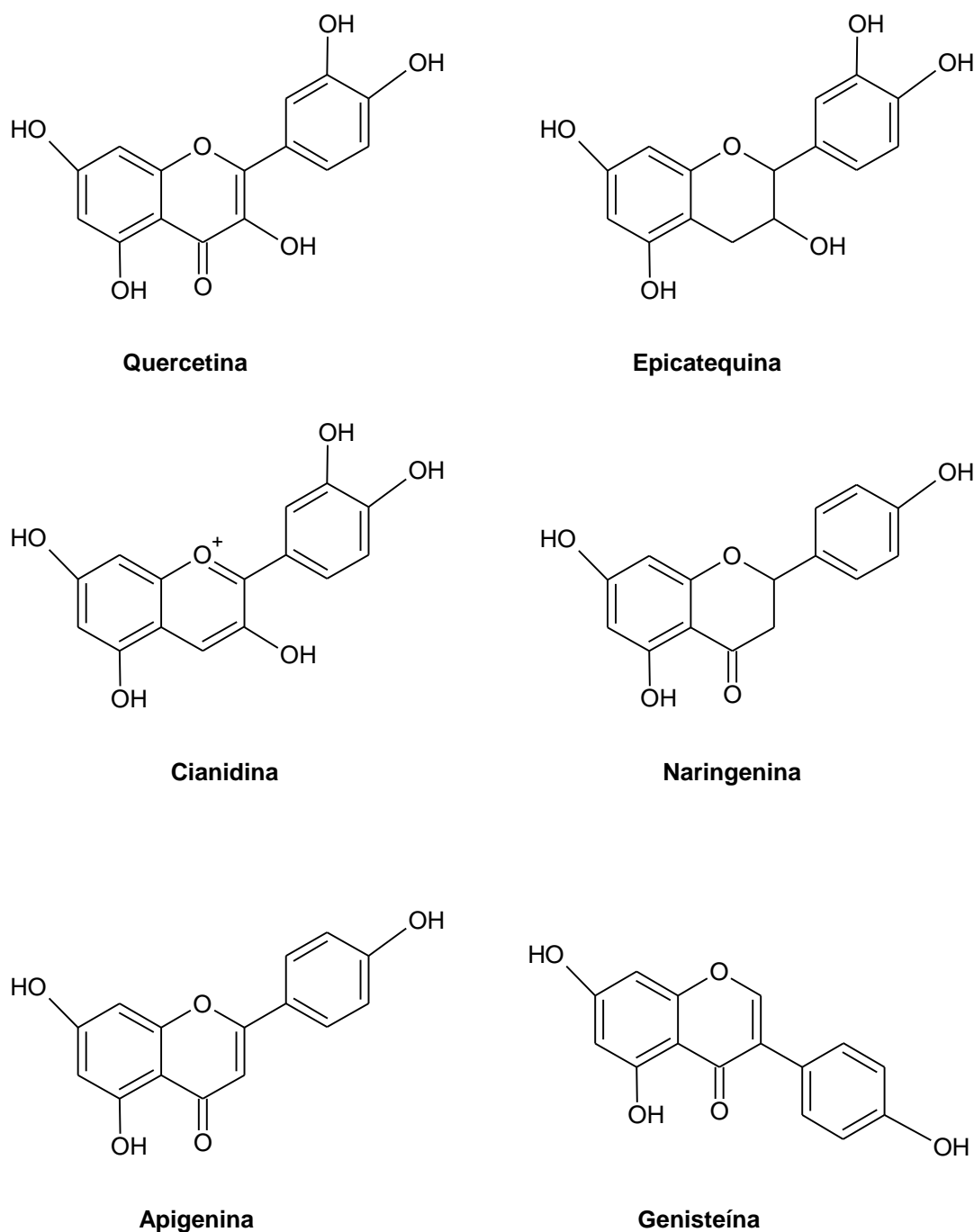
- **flavonóis** (C=C entre as posições 2 e 3, C=O na posição 4 e CHOH na posição 3 – exemplos: quercetina, kaempferol e miricetina);
- **flavonas** (C=C entre as posições 2 e 3 e C=O na posição 4 – exemplos: luteolina e apigenina);
- **favanóis** (CHOH na posição 3 – exemplos: catequina, epicatequina, epigallocatequina);
- **flavanonas** (C=O na posição 4 – exemplo: naringenina);
- **antocianidinas** (C=C entre as posições 3 e 4 e C=O<sup>+</sup> entre as posições 1 e 2 – exemplos: cianidina e malvidina);
- e **isoflavonóides** (anel B ligado à posição 3 – exemplos: genisteína e daidzeína).

A Figura 3 apresenta um exemplo de cada tipo de flavonoide (estruturas).



**Figura 2.** Estrutura geral dos flavonoides (Fonte: APAK *et al.*, 2007)





**Figura 3.** Exemplos de cada tipo de flavonoide: flavonóis (quercetina), favanóis (epicatequina), antocianidinas (cianidina), flavanonas (naringenina), flavonas (apigenina) e isoflavonoides (genisteína) (Fonte: MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2014).

Os flavonoides da dieta são normalmente encontrados na natureza como conjugados nas formas glicosiladas ou esterificadas, mas podem também ser encontrados como agliconas, especialmente em alimentos de origem vegetal cozidos ou processados. Na natureza, encontram-se muitas formas diferentes de

flavonoides glicosilados uma vez que já foram reportados mais de 80 açúcares diferentes ligados a flavonoides em alimentos de origem vegetal (LIU, 2013).

A função antioxidante dos flavonoides tem sido estudada há décadas. Eles podem agir como sequestradores de radicais livres via doação de átomos de hidrogênio ou doação de elétrons devido aos vários grupos hidroxila nas suas estruturas e o sistema de elétrons  $\pi$  altamente conjugado. Além disso, os flavonoides podem bloquear a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) através da quelação de íons metálicos de transição redox ativos. Isso pode produzir um efeito positivo na prevenção do câncer através da minimização do dano oxidativo ao DNA (MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2014).

Apesar dos flavonoides apresentarem uma potente atividade antioxidante *in vitro*, já se sabe que os compostos fenólicos são metabolizados após a ingestão em quantidade dietética relevante e que as concentrações dos metabólitos no plasma após ingestão raramente excedem nmol/L. O metabolismo começa no lúmen do intestino delgado e as modificações após a absorção ocorrem no fígado e outros órgãos. Ainda, alguns flavonoides não são absorvidos no intestino delgado e passam para o intestino grosso, onde ocorrem modificações estruturais substanciais pela microbiota colônica. Os flavonoides e seus catabólitos colônicos no intestino grosso podem influenciar a microflora e exercer um impacto na saúde colônica, selecionando bactérias probióticas ou inibindo a proliferação de células cancerosas, por exemplo (DEL RIO, *et al.*, 2010).

A ingestão de quercetina, um flavonoide abundante em diversos alimentos de origem vegetal, tem sido associada a menor risco de doenças cardiovasculares, embora os mecanismos subjacentes não sejam completamente entendidos. A quercetina é metabolizada rapidamente na mucosa intestinal humana e no fígado em conjugados glicuronídeo e sulfato, com ou sem metilação. Após o consumo de alimentos ricos em quercetina, os metabólitos da quercetina são amplamente associados com a fração que contém albumina no plasma humano (LOTITO, *et al.*, 2011).

No trabalho de SPENCER (2010) foi atribuído aos flavonoides importante atividade em processos cerebrais ligados à memória, nos quais eles exerceriam efeitos neuroprotetores devido a interações com macromoléculas responsáveis por

caminhos de sinalizações em neurônios, essenciais para a sobrevivência e diferenciação celulares e para a memória. Como a memória sofre deterioração com a idade, uma dieta rica em flavonoides poderia, eventualmente, reverter o processo de deterioração.

Na sequência serão apresentados os métodos pelos quais pode-se determinar a atividade antioxidante de substâncias, como os flavonoides.

### **3.3. Determinação da Atividade Antioxidante**

A capacidade antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de vários fatores como a estrutura dos compostos e suas concentrações no alimento. Além disso, a quantidade destes compostos nos vegetais é muito influenciada por fatores genéticos e condições ambientais e ainda pelo grau de maturação e variedade da planta. A capacidade antioxidante também é influenciada pelo solvente utilizado e pela técnica de extração utilizada, bem como pelos fatores tempo e temperatura (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

Os métodos que avaliam a capacidade antioxidante total de uma amostra (principalmente em amostras com composição desconhecida), são muito usados quando não é possível medir a atividade antioxidante dos compostos individualmente. Estes ensaios apresentam a vantagem de integrar as ações antioxidantes individuais de diferentes compostos e suas interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas. Apesar dessa vantagem integrativa, os ensaios de capacidade total antioxidante não consideram vários aspectos que podem intervir na via complexa entre um composto químico que previne a oxidação de um sistema químico e a possibilidade real desse composto agir como antioxidante *in vivo* e/ou proporcionar benefícios à saúde. Alguns ensaios avaliam a capacidade de um sistema de reagir com determinada espécie química (por exemplo peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, oxigênio singlete) porém nem todos os compostos definidos como antioxidantes reagiriam com a mesma eficiência em todos os ensaios. Portanto, dependendo dos ensaios realizados, das condições de cada ensaio e da composição da amostrada avaliada, a capacidade antioxidante total da amostra pode ser muito diferente. Além disso, nenhum dos ensaios disponíveis atualmente são sensíveis a outras defesas antioxidantes que são quantitativamente importantes como enzimas e outras moléculas que agem na defesa antioxidante de um sistema biológico. Ainda, alguns ensaios podem ser realizados sob condições

que fornecem informações sobre processos que ocorrem predominantemente em meios hidrofílicos ou lipofílicos. Dessa forma, as informações fornecidas nesses ensaios, com respeito a função antioxidante de compostos que fazem parte de um sistema complexo, tanto em termos qualitativos como quantitativos, devem ser interpretadas cuidadosamente (FRAGA; OTEIZA; GALLEANO, 2014).

Os métodos utilizados para a determinação da capacidade antioxidante podem ser classificados como métodos baseados na transferência de elétrons e métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio (APAK *et al.*, 2007).

Métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio medem a capacidade do antioxidante (AH) em sequestrar radicais livres ( $R\cdot$ ) pela doação de um átomo de hidrogênio (reações independentes do solvente e pH). A maioria dos métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio envolve reações de competição, nas quais o antioxidante e o substrato competem pelos radicais peróxil gerados termicamente através da decomposição de compostos azo (APAK *et al.*, 2007).

Métodos baseados na transferência de elétrons medem a habilidade de um antioxidante (AH) em reduzir qualquer composto (podendo ser íons metálicos, grupos carbonila e radicais) por meio da transferência de um elétron (reações dependentes do solvente e pH). Na maioria dos ensaios baseados na transferência de elétrons, os antioxidantes reagem com um indicador fluorescente ou colorimétrico (agente oxidante) que muda de cor quando é reduzido. O grau de mudança de cor (aumento ou redução da absorbância) é relacionado à concentração de antioxidantes presentes na amostra (APAK *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante de misturas contendo compostos antioxidantes que sequestram radicais livres tem sido muito avaliada por métodos diretos (métodos de competição) utilizando um composto de referência como sonda marcadora. Vários compostos de referência podem ser utilizados como sonda marcadora e a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais livres é avaliada pela extensão da supressão do consumo da sonda, medida geralmente através da fluorescência ou quimioluminescência. Métodos que utilizam esse princípio e que são bastante utilizados são o ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio) e o TRAP

(Parâmetro Antioxidante Total do Radical). O método TRAP foi o primeiro aplicado no plasma humano para medir a absorção de oxigênio utilizando eletrodo de oxigênio e então pelo decaimento da fluorescência da R-ficoeretrina (NIKI, 2010).

O ORAC é um dos métodos diretos mais utilizados, no qual a perda da fluorescência de uma sonda como a ficoeretrina ou a fluoresceína é acompanhada através do tempo na presença e na ausência de antioxidantes. A área sob a curva de decaimento da fluorescência (AUC) é calculada e o aumento líquido da AUC, isto é, a diferença entre a AUC na presença de antioxidante e a AUC na ausência de antioxidante, é utilizada como indicativo da capacidade antioxidante (NIKI, 2010).

A Tabela 2 apresenta alguns métodos *in vitro* que são utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante.

**Tabela 2.** Métodos utilizados na determinação da capacidade antioxidante de compostos alimentares.

Método	Referência
Atividade Sequestradora do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) - <i>DPPH scavenging activity</i>	BRAND-WILLIAMS <i>et al.</i> (1995), MANZOCCO <i>et al.</i> (1998); ROESLER (2007) e SCHERER; GODOY (2009).
Sequestro do Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) - <i>Hydrogen peroxide scavenging (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) assay</i>	RUCH <i>et al.</i> (1989);
Atividade sequestradora do radical Óxido Nítrico (NO <sup>•</sup> ) - <i>Nitric oxide scavenging activity</i>	DAVID (1999); GHAFOURIFAR and CADENAS (2005); MARLETTA (1989); MONCADA <i>et al.</i> (1989); VIRGINIA <i>et al.</i> (2003); MARCOCCI <i>et al.</i> (1994); GULÇIN (2012)
Atividade Sequestradora do Radical Peroxinitrito (ONOO <sup>•</sup> ) - <i>Peroxynitrite radical scavenging activity</i>	KOOY <i>et al.</i> (1994)
Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)/ Ensaio de descoloração do cátion-radical ABTS - <i>Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) method/ ABTS radical cation decolorization assay</i>	MILLER <i>et al.</i> (1993), RE <i>et al.</i> , (1999); SEERAM <i>et al.</i> (2006).
Capacidade Antioxidante Total (TRAP) - <i>Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) method</i>	GHISELLI <i>et al.</i> (1995);
Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico Fe <sup>3+</sup> (FRAP) - <i>Ferric reducing-antioxidant power assay</i>	BENZIE and STRAIN (1999)
Sequestro de Radical Ânion Superóxido (SOD) - <i>Superoxide radical scavenging activity (SOD)</i>	MEYER and ISAKSEN (1995); ROBAK and GRYGLEWSKI (1988)
Capacidade Sequestradora do Radical Hidroxil - <i>Hydroxyl radical scavenging activity</i>	KUNCHANDY and RAO (1990)
Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) - <i>Oxygen radical absorbance capacity</i>	FREI <i>et al.</i> , (1990); CAO <i>et al.</i> , (1993); PRIOR <i>et al.</i> (2003); DÁVALOS <i>et al.</i> (2004)

---

**Method**

Método do Tiocianato Férrico (FTC) - *Ferric thiocyanate method* KIKUZAKI *et al.* (1991)

Valor de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) - *Thiobarbituric acid method* OTTOLENGHI (1959)

Atividade Sequestradora do Radical DMPD<sup>+</sup> (N,N-dimetil-p-fenilenediamina) - *DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride) method* FOGLIANO *et al.* (1999)

Método do Ácido Linoleico B-caroteno - *b-carotene linoleic acid method/conjugated diene assay* KABOUCHE *et al.* (2007)

Método da Xantina Oxidase - *Xanthine oxidase method* NORO *et al.* (1983)

Poder antioxidante de redução do íon cúprico Cu<sup>2+</sup> (CUPRAC) - *Cupric ion reducing antioxidant capacity method* APAK *et al.* (2008)

Capacidade de Quelar Metais - *Metal chelating activity* SOLER-RIVAS *et al.* (2000); DINIS *et al.* (1994)

Método do Fosfomolibdênio - *Phosphomolybdenum method* PRIETO *et al.* (1999)

Poder redutor (RP) - *Reducing power method (RP)* JAYAPRAKASH *et al.* (2001)

Método da capacidade averting do radical hidroxil (HORAC) - *Hydroxyl radical averting capacity (HORAC) method* OU *et al.* (2002)

---

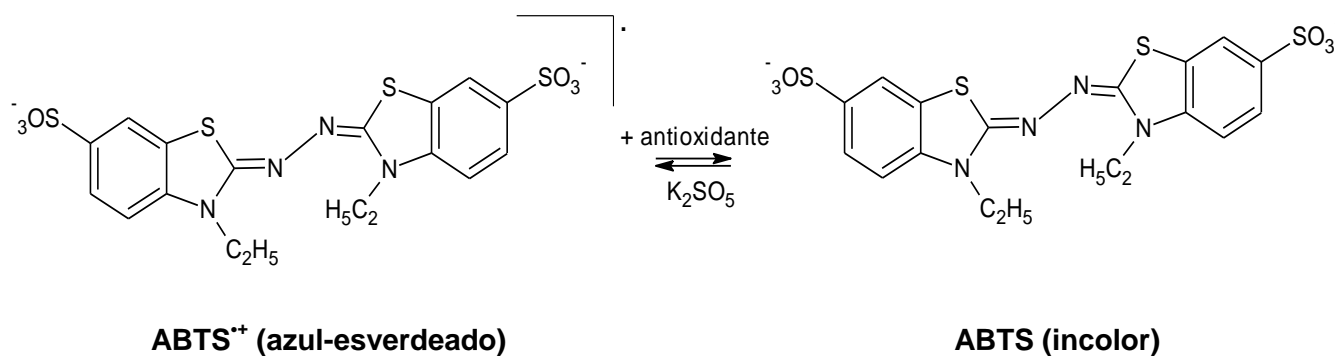
Na sequência serão descritos os métodos de determinação da atividade antioxidante escolhidos para a análise das amostras do presente estudo.

### 3.3.1. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)

O ensaio TEAC utilizando ABTS foi desenvolvido por MILLER *et al.* (1993) e mais tarde modificado por RE *et al.* (1999).

O método ABTS consiste em monitorar o decaimento do cátion-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , produzido pela oxidação do ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico), quando uma amostra contendo antioxidantes é adicionada. Como ilustrado na Figura 4, o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  reage energeticamente com uma espécie doadora de átomos de H, como os compostos fenólicos, e é convertido em ABTS, o qual é incolor (ROGINSKY; LISSI, 2005).

O cátion-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pode ser gerado tanto por via química (reação do ABTS com persulfato de potássio ou dióxido de manganês) quanto por reações enzimáticas (metamioglobina, hemoglobina). O  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  apresenta máximos de absorção nos comprimentos de onda de 415, 645, 734 e 815 nm, sendo que 415 e 734 nm são os comprimentos de onda mais adotados para monitorar a reação entre os antioxidantes e o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Em termos de quantificação, o decréscimo da absorbância do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é geralmente medido na presença do Trolox, em tempo fixo (4-6 minutos), e a capacidade antioxidante é então medida em equivalentes de Trolox (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).



**Figura 4.** Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (Fonte: RUFINO *et al.*, 2007).



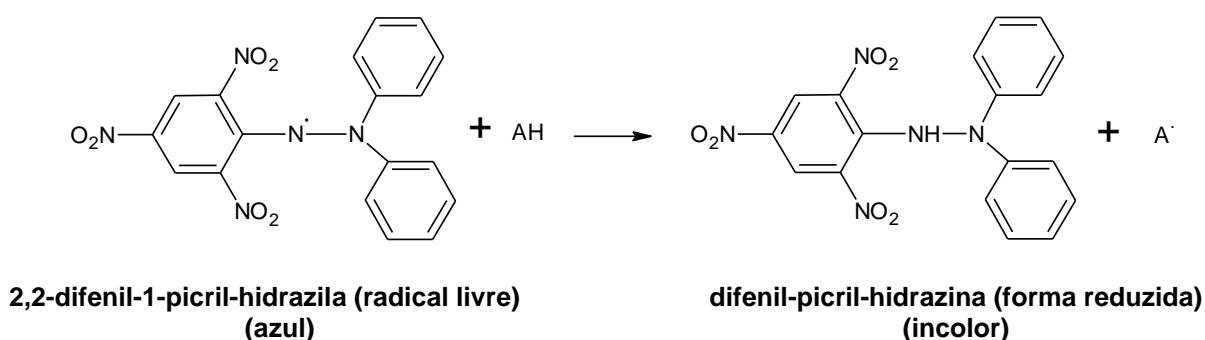
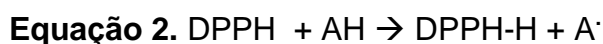
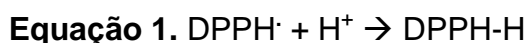
### 3.3.2. Atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O método DPPH• foi desenvolvido por BLOIS (1958) e posteriormente modificado por BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset (1995).

O DPPH é um radical estável devido à delocalização do elétron livre pela sua estrutura como um todo. A delocalização do elétron livre também é responsável pela coloração violeta do radical (ALAM; BRISTI, RAFIQUZZAMAN, 2013). Apresenta máximo de absorbância em 520 nm (PISOSCHI & NEGULESCU, 2011).

Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O Trolox é utilizado como antioxidante padrão (PISOSCHI & NEGULESCU, 2011).

No método do radical DPPH, podem ocorrer dois tipos de mecanismos de reação distintos: baseado na transferência de elétron e baseado na transferência de um átomo de hidrogênio. É difícil diferenciar esses dois mecanismos para o método DPPH, mas o principal mecanismo acontece pela transferência de elétron (Equação 1), sendo a transferência de hidrogênio uma reação marginal (Equação 2, Figura 5) (OLIVEIRA, 2014).



**Figura 5.** Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante envolvendo a transferência de um átomo de hidrogênio (Fonte: OLIVEIRA, 2014).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2007). Porém, embora seja vastamente empregado por diversos cientistas, o uso deste parâmetro como indicativo de atividade antioxidante tem sido duramente questionado (FOTI, 2015).

### 3.3.3. Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio – ORAC

O método ORAC foi desenvolvido primeiramente por GLAZER (1988) e posteriormente modificado por CAO; ALESSIO; CUTLER (1993) e OU; HAMPSCH; PRIOR (2001).

No método ORAC, uma proteína natural fluorescente, como a ficoeritrina, ou um composto sintético fluorescente, como a fluoresceína, é utilizado como sonda marcadora (ROGINSKY; LISSI, 2005). Os antioxidantes da amostra precisam reagir com os radicais livres mais rápido do que a sonda marcadora para proteger esta última da oxidação. Dessa forma, a capacidade antioxidante pode ser determinada pela cinética de competição medindo-se a curva de decaimento da fluorescência da sonda marcadora na presença e ausência dos antioxidantes, e integrando a área sob essas curvas. A área sob a curva (AUC), encontrada subtraindo-se a AUC do branco da AUC da amostra contendo antioxidantes, é um indicador da concentração total de antioxidantes da amostra. O AAPH é geralmente utilizado como gerador de radicais livres peroxil (APAK *et al.*, 2007).

Os resultados do ORAC são normalmente reportados como equivalentes de Trolox. A curva padrão é produzida com cinco concentrações de Trolox, e o equivalente de Trolox da amostra é calculado utilizando as relações linear ( $Y = a + bX$ ) ou quadrática ( $Y = a + bX + cX^2$ ) entre a concentração de Trolox (Y) (μM) e a área líquida sob a curva de decaimento da fluoresceína X ( $AUC_{amostra} - AUC_{branco}$ ) (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

O ensaio ORAC fornece uma fonte controlável de radicais peroxil que esboçam reações de antioxidantes com lipídeos em alimentos e sistemas fisiológicos, e pode ser adaptado para detectar tanto antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos através da alteração da fonte de radicais livres e do solvente. O ensaio é feito em leitor de microplacas de fluorescência e uma vez que a reação ORAC é sensível à temperatura, o controle rigoroso da temperatura da microplaca é essencial. (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

### 3.4. Determinação de Fenóis Totais e Flavonoides Totais

Dentre as diversas classes de compostos antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro* (SOUZA *et al.*, 2007).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (ROESLER, 2007). Entre os compostos fenólicos presentes nas frutas, os mais frequentemente encontrados são os flavonoides (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Na sequência serão abordados os princípios associados a ensaios de determinação de compostos fenólicos e flavonoides em alimentos.

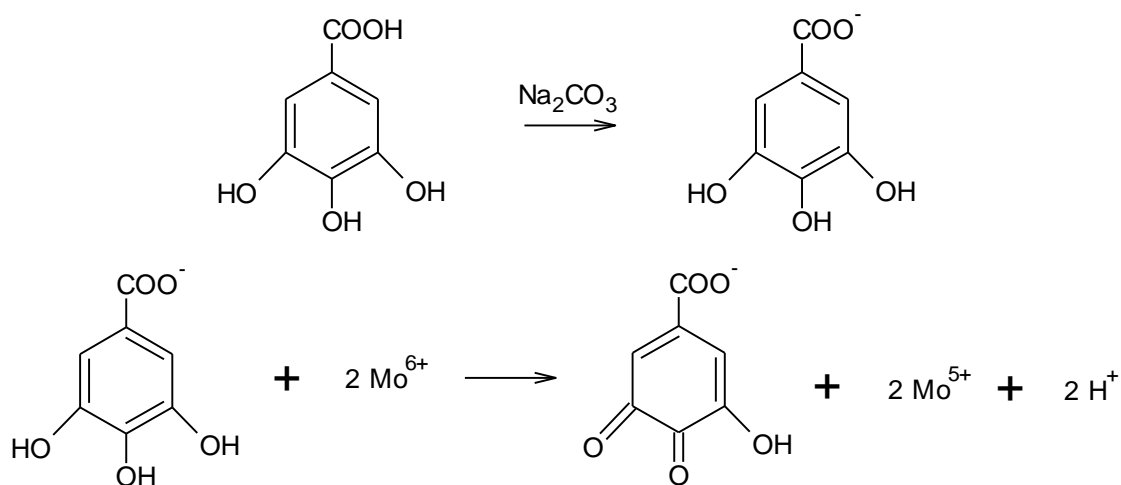
#### 3.4.1. Ensaio de Determinação de Fenóis Totais

O método de determinação de fenóis totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu foi desenvolvido por SINGLETON *et al.* (1999).

No ensaio Folin-Ciocalteu (FCR) é utilizada uma mistura de tungstato e molibdato em meio altamente básico (5-10% de  $\text{NaCO}_3$  aquoso). Os compostos fenólicos são oxidados no meio básico resultando na formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , que por sua vez reage com o molibdato formando o óxido de molibdênio,  $\text{MoO}^{4+}$ , o qual apresenta intensa absorção próximo de 750 nm (Figura 6). O resultado é frequentemente expresso em equivalentes de ácido gálico. O ensaio FCR não é

seletivo, uma vez que determina tanto monofenóis como polifenóis (ROGINSKY, LISSI, 2005).

Alguns estudos, como o de OLIVEIRA *et al.* (2011), afirmam que uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante de produtos naturais foi estabelecida. Entretanto, autores como ISMAIL *et al.* (2004) e MELO *et al.* (2008) não encontraram tal correlação nos resultados de seus estudos (ou em parte dos seus resultados).



**Figura 6.** Reação do ácido gálico com o molibdênio do reagente de Folin-Ciocalteu (Fonte: OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

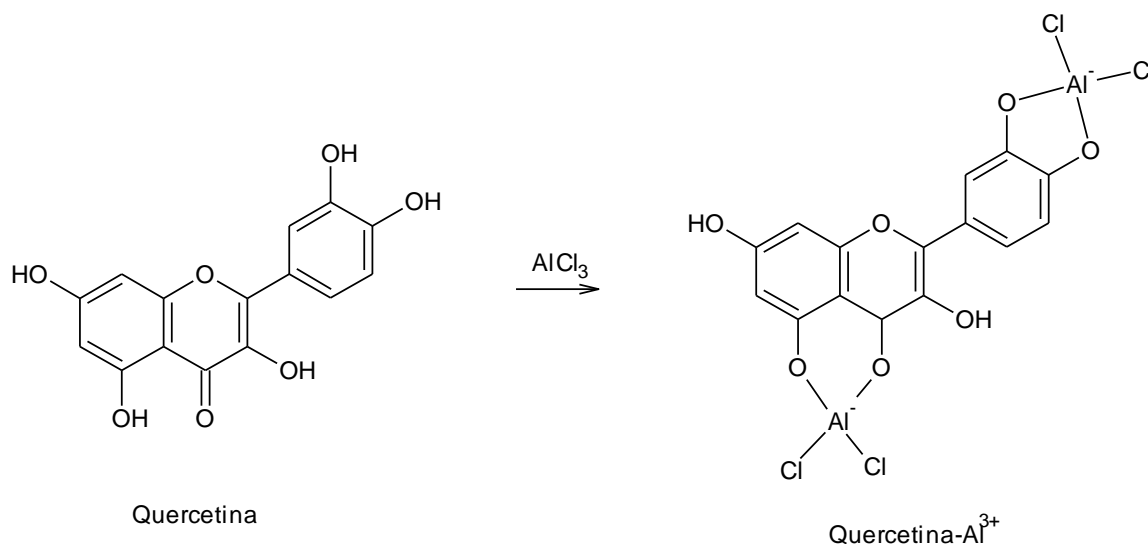
Um ponto fraco do método é que pode ocorrer superestimação do conteúdo fenólico, em larga extensão. Vários interferentes não fenólicos são conhecidos, entre eles, a vitamina C (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009).

### 3.4.2. Ensaio de Determinação de Flavonoides Totais

O método espectrofotométrico comumente utilizado para a determinação espectrofotométrica de flavonoides totais foi desenvolvido por ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING (1999). Esse método é baseado na formação de um complexo estável que envolve a reação do íon  $\text{Al}^{+3}$  do  $\text{AlCl}_3$  e as hidroxilas livres dos flavonoides (Figura 7). O monitoramento da absorbância é realizado a 510 nm.

A quantificação de flavonoides por espectrofotometria, em relação às demais técnicas como CLAE, CG e CL-EM, é uma técnica mais acessível, prática e menos

onerosa e, devido às duplas ligações presentes nos anéis aromáticos, os flavonóides podem ser determinados na região do ultravioleta ou visível (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Formação do complexo do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) o qual forma o complexo estável flavonóide-Al<sup>3+</sup> (Fonte: PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2012).

### 3.5. Mirtáceas

A família das Mirtáceas é de ocorrência pantropical, com concentrações na América do Sul, sudoeste da Ásia e Austrália. A subfamília de frutos carnosos, Myrtoideae, inclui muitas plantas economicamente importantes, culturas agrícolas e plantas ornamentais, incluindo o gênero mediterrâneo *Myrtus*, temperos como cravo-da-índia, pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*) e Bay rum (*Pimenta racemosa*) e os frutos de *Psidium* (goiaba), *Myrciaria*, *Eugenia*, *Syzygium*, *Plinia* e *Luma* (REYNERTSON *et al.*, 2008).

As Mirtáceas compreendem aproximadamente 140 gêneros e 3.500 espécies. É uma das famílias de angiospermas mais importantes do Brasil, concentrada em apenas uma tribo, Myrteae e três subtribos, Myrciinae, Eugeniinae e Myrtinae. Existem 23 gêneros e 997 espécies registradas no Brasil, distribuídas principalmente na Mata Atlântica, onde 636 espécies podem ser encontradas (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014).

Algumas espécies de Mirtáceas são exploradas comercialmente, como, por exemplo, a goiaba (*Psidium guajava* L.), a jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.) e a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), enquanto outras são consumidas in natura, como a uvaia (*Eugenia pyriformis* (Cambes) Kausel) e o guabijú (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). Essas espécies representam apenas uma fração pequena do grande potencial econômico da família, considerando o grande número de frutos comestíveis produzidos por espécies que ainda não são comercialmente exploradas (DAMETTO, 2014).

A família das Mirtáceas pode ser encontrada em diversos tipos de vegetação, como Floresta Ombrófila ou Mata Atlântica de encostas, Floresta Amazônica, Restinga e Cerrado. É uma das famílias mais citadas em estudos florísticos e fitossociológicos (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014).

Os frutos tropicais das Mirtáceas crescem sob condições de alto stress oxidativo pela intensa luz solar e calor, e os compostos fenólicos inibem a peroxidação lipídica e o dano ultravioleta nos tecidos das plantas além de proteger os sistemas dos mamíferos quando ingeridos (REYNERTSON *et al.*, 2008).

A goiaba amarela (*Psidium cattleianum* Sabine), a guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) e a uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) são exemplos usualmente utilizados na medicina popular e cultivados em hortas que possuem grande potencial para exploração econômica, uma vez que apresentam produtividade alta com baixo custo de plantio e manutenção (PEREIRA *et al.*, 2012).

### 3.5.1. Araçá-boi

O araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) é uma árvore frutífera da família das Mirtáceas e nativa da floresta tropical Amazônica. O araçazeiro-boi é normalmente cultivado no Brasil, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia. O araçá-boi é uma fruta de formato arredondado ou achatado, pesando de 30 a 800 g e possui uma fina casca amarela e polpa ácida de coloração amarelo-clara (Figura 8). Possui de 4 a 10 sementes. Sua polpa é carnosa, porém bastante ácida e, portanto, não é indicada para consumo *in natura*. Apesar disso, é muito utilizada no preparo de sucos, geleias e sorvetes. É também muito útil em misturas com polpas de frutas de baixa acidez (SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA, 2008). O interesse por essa fruta cresceu bastante na Colômbia nos últimos anos devido à busca constante por novos

produtos e sabores exóticos além de suas aplicações medicinais tradicionais e de seu potencial para exportação (GARZÓN *et al.*, 2012). Segundo SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA (2008), o araçá-boi foi introduzido na região sul da Bahia devido ao seu potencial econômico e funcional mas ainda não é produzido em larga escala. Segundo os mesmos autores, a polpa do araçá-boi poderá ter grande importância na fabricação de néctares com frutas menos ácidas como manga, mamão e maçã. Dessa forma o araçá-boi foi escolhido nesse estudo devido ao seu potencial econômico e funcional e o néctar de maçã foi escolhido para a suplementação com o araçá-boi liofilizado por possuir baixa acidez e por ser um dos néctares mais vendidos.



**Figura 8.** Frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) (Fonte: arquivo pessoal)

A propagação do araçazeiro é feita principalmente por sementes, as quais devem vir de plantas bem produtivas e que produzam frutos grandes. As sementes de araçá-boi demoram de 60 a 180 dias para germinar e mais 180 dias para o plantio. O araçazeiro adapta-se bem aos solos de textura média (argilo-arenosos) profundos e bem drenados. A época de plantio depende da umidade do solo sendo recomendado o período de início de chuvas (SACRAMENTO *et al.*, 2008).

Segundo HERNÁNDEZ *et al.* (2009), o araçá-boi é um fruto climatérico de amadurecimento rápido com produção moderada de etileno e apresenta uma vida de prateleira de menos de 5 dias a 20°C.

Os frutos de araçá-boi, quando maduros, são muito delicados e podem ser facilmente amassados. Portanto, o transporte por longas distâncias se torna difícil.

Por essa razão, é recomendado, quando existe uma quantidade grande de fruta disponível, processar a polpa e comercializá-la congelada.

As poucas pesquisas existentes sobre o araçá-boi sugerem seu potencial nutricional e funcional. Foi encontrado nessa fruta um conteúdo alto de derivados glicosilados da quercetina, cuja potência como inibidores de enzimas do metabolismo de carboidratos parece estar relacionado ao padrão de glicosilação, segundo estudo de NERI-NUMA *et al.* (2013). Nesse mesmo estudo, o extrato da polpa de *Eugenia stipitata* mostrou conteúdo de fenólicos totais de 184,08 mg EAG/g. Os níveis de miricetina, quercetina e kaempferol em *E. stipitata* obtidos no estudo de NERI-NUMA, *et al.* (2013), foram de 17,0 mg/100 g, 5,1 mg/100 g e 3,7 mg/100 g, respectivamente. Em um estudo prévio, foram encontrados 14,4 mg de quercetina e 2,5 mg de kaempferol por 100 g de polpa fresca de *E. stipitata* (GONÇALVES *et al.*, 2010). Em outro estudo, com 14 frutas da família das Mirtáceas, foram observadas, em cinco espécies, quantidades significativas de miricetina, variando de 1 a 4 g/100 g, e quantidades de quercetina entre 1 e 28 g/100 g em 13 das 14 espécies analisadas (REYNERTSON *et al.*, 2008). Portanto, é possível que a quantidade de fenólicos totais e atividade antioxidante exibidas pela *E. stipitata* possa contribuir com as atividades antimutagênica e antígeno-tóxica (NERI-NUMA, *et al.*, 2013).

Segundo estudo de CUELLAR *et al.* (2013), que avaliaram a atividade antioxidante do araçá-boi em quatro estágios de maturação diferentes (verde, pintado, maduro e sobremaduro), os estados verde e maduro apresentaram maior atividade antioxidante (segundo os métodos hidrofílicos de ABTS, DPPH, FRAP), sendo os compostos fenólicos os principais contribuintes da atividade antioxidante.

Essa espécie demonstra um grande potencial para conquistar um lugar proeminente no mercado nacional e internacional, principalmente como bebida natural ou comercializada como polpa congelada ou suco engarrafado (INPA, 2015).

### **3.6. Bebidas funcionais**

As bebidas funcionais podem ser consideradas como aquelas que promovem benefícios adicionais para a manutenção da saúde, além das propriedades



nutricionais básicas. Elas podem conter compostos com atividade antioxidante, oligossacarídeos e/ou outros compostos que auxiliam na saúde do organismo. Além disso, as bebidas funcionais ajudam a nos manter hidratados e ainda podem auxiliar no desempenho físico ou simplesmente contribuir para o bem estar geral. São uma parte importante do estilo de vida de cada país. Os países asiáticos tendem a preferir bebidas lácteas, ao passo que os americanos e europeus preferem uma gama de produtos voltada a águas e sucos fortificados. México e América do Sul, por sua vez, têm evidenciado rápido crescimento no consumo de bebidas esportivas e energéticos. Portanto, as bebidas funcionais representam uma grande oportunidade para adicionar ingredientes que aumentem o apelo aos consumidores (FORTITECH, 2013).

Na medida em que os consumidores continuam a buscar alternativas saudáveis, os fabricantes de bebidas precisarão desenvolver produtos ou extensões em suas linhas que não apenas foquem no bem estar geral, mas em condições específicas de saúde como controle de peso, função cognitiva ou alívio do estresse. Esta é uma tendência de mercado que tem mostrado grande aceleração. Principalmente, os mercados emergentes como Brasil, Índia, China e Rússia tem mostrado alto crescimento no desenvolvimento e lançamento de bebidas contendo inúmeros ingredientes funcionais, onde o único limitante é a imaginação para o desenvolvimento de diferentes conceitos de bebidas (FORTITECH, 2013).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais e Reagentes

Os frutos maduros de araçá-boi foram doados pela fazenda Kamui, localizada em Ituberá, no estado da Bahia. Foram coletados em um único lote 20 kg de frutos maduros que em seguida foram transportados para a Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP/SP armazenados em saco plástico a 5°C até o momento do preparo do AL.

O néctar de maçã utilizado nas análises foi o da marca SUFRESH, lote 10983-4 (validade 06/04/2016). Foram utilizados aproximadamente 15 L do néctar para a realização de todas as análises. Os reagentes utilizados em todos os testes e análises estão relacionados a seguir:

- AAPH – 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);
- ABTS – 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), sal diamônio (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);
- Ácido acético (p.a., Ecibra, Santo Amaro-SP, Brasil)
- Ácido metafosfórico (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA)
- Ácido oxálico (p.a., Synth, Diadema-SP, Brasil);
- Bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Carbonato de sódio (p.a. Ecibra, Santo Amaro-SP, Brasil);
- Cloreto de alumínio (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);
- DCFI – 2,6 diclorofenol-indofenol - sal sódico, 98+% (Acros Organics, New Jersey, EUA);
- DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);
- Etanol (p.a., Dinâmica, Diadema-SP, Brasil);
- Fenoltaleína (p.a., Synth, Diadema-SP, Brasil);
- Fluoresceína sódica (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);
- Fosfato de sódio dibásico (Synth, Diadema-SP, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Synth, Diadema-SP, Brasil)
- Hidróxido de sódio (p.a., Synth, Diadema-SP, Brasil);
- Metanol (p.a., Chemco, Hortolândia-SP, Brasil);
- Nitrito de sódio (p.a., Dinâmica, Diadema-SP, Brasil);
- Ácido gálico (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);

- Catequina (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);
- Trolox - 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Sigma-Alcrich Co, St. Louis, MO, EUA);
- Persulfato de potássio (p.a., Synth, Diadema-SP, Brasil);
- Reagente de Folin-Ciocalteau (p.a., Dinâmica, Diadema-SP, Brasil).

#### **4.2. Preparo do araçá-boi liofilizado (AL)**

Após higienização (lavagem em água corrente), a parte comestível da fruta (casca e polpa) foi separada das sementes manualmente, processada em liquidificador, dividida em sacos plásticos (aproximadamente 500 g por saco), pesada e imediatamente congelada para posterior liofilização. A amostra foi então liofilizada a -26°C por aproximadamente 72 horas. O AL foi colocado novamente em sacos plásticos e acondicionado a vácuo em freezer (-18°C) até o momento das análises.

#### **4.3. Teste de Comparação Múltipla**

O teste sensorial de Comparação Múltipla foi realizado de acordo com os critérios da ABNT (1995). Participaram do teste 26 provadores não treinados, consumidores de néctares de frutas. Cada provador recebeu uma amostra padrão (néctar de maçã sem enriquecimento), quatro amostras codificadas, uma ficha de avaliação (ANEXO 1) e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2). Uma das amostras codificadas consistiu do próprio padrão e as outras três amostras consistiram do néctar de maçã enriquecido com AL nas concentrações de 5, 10 e 20 g/L. Os provadores receberam 20 mL de cada amostra, a 4°C, em copos plásticos de 50 mL. Foram utilizados códigos de três dígitos e as amostras foram apresentadas em blocos completos balanceados (MACFIE *et al.*, 1989). Na ficha de avaliação os provadores foram questionados sobre a diferença sensorial global entre o néctar de maçã sem enriquecimento (padrão) e as amostras codificadas (DUTCOSKY, 2011).

#### **4.4. Teste de Aceitação**

O teste sensorial de aceitação foi realizado de acordo com os critérios da ABNT (1998). Participaram do teste 112 provadores não treinados, consumidores de néctares de frutas. Cada provador recebeu, de forma monádica, seis amostras codificadas de néctar de maçã, sendo cinco amostras de néctar de maçã suplementado com as concentrações de 1, 5, 10, 15 e 30 g/L, respectivamente, de AL e uma amostra de néctar de maçã sem suplementação. Os provadores receberam também uma ficha de avaliação (ANEXO 3) para cada amostra e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 4). Os provadores receberam 20 mL de cada amostra, a 4°C, em copos plásticos de 50 mL. As amostras foram apresentadas em blocos completos balanceados (MACFIE *et al.*, 1989) com codificação aleatória de três dígitos. Na ficha de avaliação os provadores foram questionados, por meio de escala não estruturada de 9 cm (STONE; SIDEL, 2004), sobre a aceitação em relação aos seguintes parâmetros: Aparência, Cor, Textura, Sabor, Textura e Impressão Global. Adicionalmente, os provadores foram também questionados sobre a intenção de compra aferida por meio de uma escala de cinco pontos estruturada variando de “1 = certamente não compraria” a “5 = certamente compraria” (MEILGAARD; CIVILLE; CARR., 1999).

Os ensaios de análise sensorial foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (ANEXO 5) e foram efetuados no Laboratório de Ciência Sensorial e Estudo de Consumidor do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

#### **4.5. Determinação da composição centesimal do AL**

A composição das frutas foi avaliada de acordo com as determinações da Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence (AOAC: Official Methods of Analysis, Washington, 2012) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

##### **4.5.1. Determinação da Umidade**

A determinação da umidade do AL foi feita de acordo com o método gravimétrico nº 920.151 da AOAC (2012). Foi pesado 1 g de AL em placa de Petri

pequena previamente seca e pesada. A amostra foi colocada na estufa a 70 °C por 4 horas. Após resfriamento em dessecador e pesagem, a amostra foi colocada novamente na estufa a 70 °C até obtenção de peso constante.

A umidade do fruto de araçá-boi fresco foi obtida após a determinação da umidade do AL, utilizando para o cálculo a quantidade de água perdida no processo de liofilização do fruto (diferença de peso antes e após a liofilização).

#### *4.5.2. Determinação de Cinzas*

A determinação de cinzas do AL foi realizada em triplicata pelo método gravimétrico nº 940.26 da AOAC (2012). Foram carbonizados 3 g de AL em cápsula de porcelana, previamente seca e pesada, a 550°C em mufla, por 5 horas. Após resfriamento e pesagem, a amostra foi carbonizada novamente a 550°C até obtenção de peso constante.

#### *4.5.3. Determinação de Lipídeos*

A determinação de lipídeos foi realizada em triplicata para o AL de acordo com o método nº 948.22 da AOAC (2012). Foram utilizados 3 g de AL e a extração foi feita em extrator Soxhlet com éter de petróleo por 6 horas. O éter foi então evaporado, o resíduo foi seco por 1 hora a 105°C em estufa e em seguida resfriado em dessecador e pesado. O processo de secagem e pesagem foi feito em intervalos de 30 minutos até a obtenção de peso constante.

#### *4.5.4. Determinação de Proteínas*

A determinação de nitrogênio total foi feita em triplicata para o AL pelo método nº 920.152 (micro Kjeldahl) da AOAC (2012). Foram pesados 0,5 g do AL, que em seguida foram transferidos para um frasco de digestão. Foram adicionados 1,5 g de uma mistura contendo 5% de  $\text{CuSO}_4$  e 95% de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  e adicionou-se também 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . O frasco foi colocado no digestor de proteína e aquecido, sendo a temperatura aumentada em 50°C em intervalos de 15 minutos, até atingir a temperatura de 350°C. O sistema foi mantido nessa temperatura até o clareamento da solução. Após o resfriamento, foram adicionados 10 mL de água destilada no

frasco. Em um erlenmeyer, foram adicionados 15 mL de solução de ácido bórico a 4% e 5 gotas de indicador. Adicionou-se 25 mL de solução de NaOH 50% no frasco e este foi então conectado ao bulbo de destilação do condensador, ficando a ponta do condensador imersa na solução de ácido bórico 4% do erlenmeyer. O frasco foi aquecido até todo  $\text{NH}_3$  ser destilado. A solução do erlenmeyer foi então titulada com solução padrão de HCl.

O fator de conversão utilizado para a conversão de N em proteína foi  $N \times 6,25$ .

#### *4.5.5. Determinação de Carboidratos*

O teor de carboidratos foi calculado por diferença (100 g – gramas totais de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e fibra alimentar), segundo a Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003.

#### *4.5.6. Determinação de fibra solúvel e insolúvel*

Os teores de fibra alimentar solúvel, insolúvel e total foram determinados em triplicata para o AL seguindo o método 985.29 da AOAC (2012). Foram pesados 0,5 g de AL em erlenmeyer de 500 mL. Em seguida adicionou-se 25 mL de tampão fosfato pH 6,0 e 50  $\mu\text{L}$  de solução de alfa-amilase. O erlenmeyer foi coberto com papel alumínio e o sistema foi levado em banho-maria a 100°C por 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, o pH foi ajustado para 7,5 com a adição de 5 mL de solução de NaOH 0,275 M. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução de protease e o erlenmeyer foi coberto com papel alumínio e incubado por 30 minutos a 60°C com agitação contínua. Após resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 5 mL de solução de HCl 0,325 M e o pH foi ajustado com essa solução até obtenção de pH 4,5. Foram então adicionados 100  $\mu\text{L}$  de amiloglicosidase, o erlenmeyer foi coberto com papel alumínio e incubado por 30 minutos a 60°C com agitação contínua.

Para a determinação de fibra insolúvel, o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado em cadinho com celite fixada com etanol 78% (cadinho foi previamente

seco em estufa e pesado após adição de celite). O resíduo foi lavado com 20 mL de água destilada pré aquecida a 70°C. Em seguida, todo o filtrado foi transferido para um erlenmeyer de 600 mL, que foi reservado para a análise de fibra solúvel. O resíduo do cadinho foi lavado sucessivamente com 20 mL de etanol 95% e 20 mL de acetona e então o cadinho com o resíduo da filtração foi seco em estufa a 105°C por uma noite. Após resfriamento em dessecador, o cadinho foi pesado. Foi feito branco para medir qualquer contribuição dos reagentes para o resíduo.

Para a análise de fibra solúvel, adicionou-se ao erlenmeyer contendo o filtrado (reservado na etapa de determinação de fibra insolúvel) 250 mL de etanol 95% pré aquecido a 60°C. A solução foi deixada em repouso, em temperatura ambiente, até o dia seguinte. Foi feita então filtração à vácuo de todo conteúdo do erlenmeyer em cadinho com celite fixada com etanol 78% (cadinho foi previamente seco em estufa e pesado após adição de celite). O resíduo foi lavado sucessivamente com 30 mL de etanol 78%, 30 mL de etanol 95% e 30 mL de acetona. O cadinho com o resíduo da filtração foi deixado em estufa a 105°C, por 24 horas, para secagem. Após resfriamento em dessecador, o cadinho foi pesado. Foi feito branco para medir qualquer contribuição dos reagentes para o resíduo.

#### 4.6. Preparo do AL reconstituído

Para as análises de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e vitamina C do AL foi necessária a reconstituição do mesmo. A reconstituição foi feita com base na umidade do fruto fresco de acordo com o seguinte cálculo:

$$W_r = U \times m_r \quad \text{e} \quad m_{AL} = m_r - W_r$$

em que

$W_r$  = Quantidade de água destilada a ser adicionada ao AL na reconstituição;

$U$  = % umidade do fruto fresco;

$m_r$  = Quantidade total de AL reconstituído a ser preparado, em gramas;

$m_{LA}$  = Quantidade de AL utilizada na preparação do AL reconstituído.

#### **4.7. Determinação das propriedades físico-químicas e do teor de vitamina C no néctar, AL reconstituído e néctares suplementados com AL**

Para a realização das análises de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e vitamina C, o AL foi reconstituído, considerando-se a umidade da polpa determinada previamente. Dessa forma, a reconstituição foi feita misturando-se a quantidade de AL referente a 12,07% da massa total com a quantidade de água destilada referente aos restantes 87,93% da massa total. Após misturar o AL com a água destilada, com auxílio do vortéx por cerca de 1 minuto, a solução foi centrifugada a 5°C, 10.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi recolhido e utilizado nas análises de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e vitamina C.

##### *4.7.1. Determinação do pH*

A determinação do pH foi realizada com auxílio de pHmetro, segundo método nº 981.12 da AOAC (2012) para as amostras do néctar de maçã, do néctar de maçã suplementado com o AL nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 30 g/L e do AL reconstituído.

##### *4.7.2. Acidez Total Titulável (ATT)*

A determinação da acidez total titulável foi realizada em duplicata, de acordo com o método nº 942.15 da AOAC (2012). Foi preparada uma solução de NaOH 0,1 M que foi em seguida padronizada com ácido oxálico. Para a titulação do néctar de maçã, do néctar de maçã suplementado nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 30 g/L de AL e do AL reconstituído procedeu-se da seguinte forma: a amostra foi filtrada em papel de filtro à vácuo e, posteriormente, foram pesados cerca de 5 g do filtrado em Erlenmeyer. Adicionou-se então ao erlenmeyer 100 mL de água destilada, 3 gotas de solução de fenolftaleína e a solução foi titulada com a solução padronizada de NaOH 0,1 M até coloração rósea persistente por 30 segundos.



#### *4.7.3. Determinação de Sólidos Solúveis Totais (SST)*

A determinação de sólidos solúveis totais foi feita com auxílio de um refratômetro, segundo método nº 932.12 da AOAC (2012). As leituras do Brix para as amostras do néctar de maçã, néctar de maçã suplementado nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 30 g/L de AL e AL reconstituído foram realizadas a 25° C, pingando-se 1 gota de amostra no prisma, em duplicata.

#### *4.7.4. Determinação de vitamina C*

A determinação do teor de vitamina C foi realizada em duplicata, de acordo com o método nº 365/IV do IAL (2008), pela redução do indicador 2,6-diclorobenzenoindofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico, para a amostra do néctar de maçã sem suplementação e para o AL reconstituído.

Para o preparo da solução de Tillmans foram dissolvidos 42 mg de bicarbonato de sódio em 50 mL de água destilada, adicionando-se em seguida 50 mg de DCFI. Essa solução foi então diluída até 200 mL com água destilada em balão volumétrico e filtrada em papel de filtro à vácuo.

A solução ácida foi preparada a partir da dissolução de 15 g de ácido metafosfórico em 40 mL de ácido acético p.a., adicionando-se em seguida 450 mL de água destilada, com posterior agitação e filtragem em papel de filtro à vácuo.

A solução-padrão de ácido ascórbico foi preparada a partir da dissolução de 100 mg de ácido ascórbico em 100 mL da solução ácida, em balão volumétrico, e em seguida diluindo-se 10 vezes a solução (10 mL de solução da solução de ácido ascórbico diluída com a solução ácida até 100 mL em balão volumétrico).

Para a padronização da solução de Tillmans foram pipetados 4 mL da solução diluída de ácido ascórbico, 6 mL da solução ácida e adicionados 50 mL de água destilada em um Erlenmeyer. Essa solução foi então titulada com a solução de Tillmans até a obtenção de coloração levemente rosada e estável por 15 segundos. Foi feito um branco, substituindo a solução de ácido ascórbico pela solução ácida para descontar no cálculo do fator da solução de Tillmans.

Para a titulação das amostras, alíquotas do néctar comercial de maçã e do AL reconstituído foram filtradas em papel de filtro à vácuo. Em seguida, foram pipetados 10 mL do filtrado, adicionados 10 mL de solução ácida e essa solução foi filtrada. Foram então pipetados 10 mL desse filtrado em um Erlenmeyer, adicionados 50 mL de água destilada e essa amostra foi titulada com a solução de Tillmans padronizada até obtenção de coloração levemente rosada e estável por 15 segundos. Foi feito um branco constituído de 10 mL da solução ácida e com volume de água destilada igual ao da solução de Tillmans gasto na titulação da amostra.

O teor de vitamina C nos néctares suplementados com AL foi calculado considerando o teor de vitamina C no néctar e no AL, seguindo a seguinte equação:

$$VC_{NS} = VC_{AL} \times PS/100 + VC_N \times (100 - PS)/100$$

onde:

$VC_{NS}$  = teor de vitamina C no néctar suplementado com AL;

$VC_{AL}$  = teor de vitamina C no AL;

$VC_N$  = teor de vitamina C no néctar sem suplementação;

PS = percentual de suplementação de AL no néctar suplementado.

#### 4.8. Determinação de Fenóis Totais

Este ensaio foi realizado de acordo com o método proposto por ROESLER *et al.* (2007). Em balões volumétricos de 25 mL foram preparadas soluções de 160 mg/mL em metanol 50% do néctar comercial de maçã sem suplementação e do néctar suplementado com AL em cada uma das concentrações (1, 5, 10, 15 e 30 g/L). No caso do AL, preparou-se solução de 3 mg/mL em metanol 50%. Todas as soluções foram agitadas em vórtex por 30 segundos e levadas ao banho ultrassônico por 2 horas a 10°C. Após essa etapa de extração, as soluções foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 rpm e 5°C. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos e as amostras de néctar e néctar suplementado foram diluídas em sete concentrações (140, 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mg/mL). A amostra

de AL também foi diluída em sete concentrações (2,6; 2,2; 1,8; 1,4; 1,0; 0,6 e 0,2 mg/mL).

Para a curva padrão, foi preparada solução de 60  $\mu\text{mol/L}$  de ácido gálico em metanol 50%, a partir de solução mãe de 500  $\mu\text{mol/L}$ , estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A solução de 60  $\mu\text{mol/L}$  foi então diluída em sete concentrações (50, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ).

A reação colorimétrica foi realizada em triplicata adicionando-se em cada microtubo 60  $\mu\text{L}$  de amostra (soluções padrão, sobrenadante dos extratos de néctar comercial de maçã, néctar comercial de maçã suplementado com AL nas diferentes concentrações ou de AL), 300  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu a 10% e 240  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio a 7,5%. As misturas foram incubadas durante 5 minutos em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$  para desenvolvimento de cor. As leituras de absorbância foram realizadas a 750 nm em espectrofotômetro (DU-640<sup>TM</sup>, Beckamn-Coulter – Brea, CA, USA), utilizando-se metanol 50% como branco. A quantidade total de fenóis da amostra foi quantificada utilizando curva padrão preparada com ácido gálico e o teor de fenóis totais foi expresso como mg de ácido gálico/ mL de amostra.

#### **4.9. Determinação de Flavonoides Totais**

O ensaio foi realizado conforme o método proposto por ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING (1999). Em balões volumétricos de 25 mL foram preparadas soluções de 600 mg/mL do néctar comercial de maçã sem suplementação e do néctar suplementado com AL em cada uma das concentrações (1, 5, 10, 15 e 30 g/L) em água destilada. No caso do AL preparou-se solução de 50 mg/mL em água destilada. As soluções foram então agitadas em vórtex e levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$ . Após a extração, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 5.000 rpm e  $5^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos e as amostras foram diluídas em sete concentrações (525, 450, 375, 300, 225, 150 e 75 mg/mL). A amostra de AL também foi diluída em sete concentrações (45, 35, 30, 25, 18, 12 e 6 mg/mL).

Para a curva padrão, foram preparadas sete diluições (430, 350, 280, 200, 150, 100 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) a partir de solução mãe de 500  $\mu\text{mol/L}$  de catequina, mantida estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A reação colorimétrica foi realizada, em triplicata, adicionando-se em cada microtubo 240  $\mu\text{L}$  de água destilada, 60  $\mu\text{L}$  da solução da amostra (soluções padrão, sobrenadante dos extratos de néctar de maçã comercial, néctar de maçã suplementado com AL em cada uma das concentrações ou AL), 18  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{NaNO}_2$  (5%) 18  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{AlCl}_3$  (10%), 120  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  (1  $\text{mol/L}$ ) e 144  $\mu\text{L}$  de água destilada. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (DU-640™, Beckman-Coulter – Brea, CA, USA) a 510 nm, utilizando-se água destilada como branco. A quantidade total de flavonoides da amostra foi quantificada utilizando a curva padrão preparada com catequina e expressa como mg de catequina/ mL de amostra.

#### **4.10. Determinação da atividade antioxidante**

A determinação da atividade antioxidante foi efetuada por três diferentes métodos, conforme procedimentos abaixo.

##### *4.10.1. Atividade Sequestradora do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)*

O ensaio foi realizado conforme os métodos propostos por ROESLER (2007) e SCHERER; GODOY (2009). Em balões volumétricos de 25 mL foram preparadas soluções de 140 mg/mL em metanol PA do néctar de maçã comercial e do néctar suplementado com AL em cada uma das concentrações (1, 5, 10, 15 e 30 g/L). No caso do AL preparou-se solução de 3,5 mg/mL em metanol PA. Todas as soluções foram agitadas em vórtex por 30 segundos e levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$ . Após essa etapa de extração, as soluções foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 rpm e  $5^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos e as amostras foram diluídas em sete concentrações (120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mg/mL). A amostra de AL também foi diluída em sete concentrações (3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 e 0,25 mg/mL).

Para a curva padrão, foi preparada solução de 200  $\mu\text{mol/L}$  de Trolox em metanol a partir de solução mãe de 1500  $\mu\text{mol/L}$ , mantida estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A solução de 200  $\mu\text{mol/L}$  foi então diluída em sete concentrações (175, 150, 125, 100, 75, 50 e 25  $\mu\text{mol/L}$ ).

A reação colorimétrica foi realizada em triplicata, adicionando-se em cada microtubo 100  $\mu\text{L}$  da solução da amostra (soluções padrão, sobrenadante dos extratos de néctar de maçã comercial, AL, néctar de maçã suplementado com AL em cada uma das concentrações) e 500  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH (0,004%; m/v). Os microtubos foram então incubados durante 30 minutos em local escuro, à temperatura ambiente. O branco da reação foi preparado seguindo-se o mesmo procedimento descrito, com adição de 100  $\mu\text{L}$  de metanol PA no lugar da amostra. O percentual do decréscimo na absorbância foi medido pela concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. As mudanças nas absorbâncias das soluções foram acompanhadas a 517 nm em espectrofotômetro (DU-640™, Beckman-Coulter – Brea, CA, USA).

#### 4.10.2. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)

Neste ensaio foi utilizado o radical livre  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , obtido pela reação de 5 mL de ABTS (7 mM) com 88  $\mu\text{L}$  de persulfato de potássio 140 mM (concentração final de 2,45 mM), conforme método descrito por RE *et al.* (1999). O sistema foi mantido em repouso, a temperatura ambiente, por 16 horas, em ausência de luz. Uma vez formado o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , o mesmo foi diluído com etanol absoluto até a obtenção de valor de absorbância de  $0,700 \pm 0,020$  a 734 nm.

Em balões volumétricos de 25 mL foram preparadas soluções de 70 mg/mL do néctar de maçã comercial e do néctar suplementado com AL em cada uma das concentrações (1, 5, 10, 15 e 30 g/L). No caso do AL preparou-se solução de 1,2 mg/mL. Todas as soluções foram agitadas em vórtex por 30 segundos e levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos, a  $10^{\circ}\text{C}$ . Após essa etapa de extração, as soluções foram centrifugadas por 5 minutos, a 5.000 rpm e  $5^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos e as amostras foram diluídas em sete

concentrações (60, 50, 40, 30, 20, 10 e 5 mg/mL). A amostra de AL também foi diluída em sete concentrações (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 mg/mL)

Para a curva padrão, foi preparada uma solução de 120  $\mu\text{mol/L}$  de Trolox a partir de uma solução mãe de 1500  $\mu\text{mol/L}$ . A solução de 120  $\mu\text{mol/L}$  foi então diluída em sete concentrações (100, 80, 60, 40, 20, 10 e 5  $\mu\text{mol/L}$ ).

A reação colorimétrica foi realizada em triplicata, adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  da solução da amostra (soluções padrão, sobrenadante dos extratos de néctar de maçã comercial, AL, néctar de maçã suplementado com AL em cada uma das concentrações) e 500  $\mu\text{L}$  da solução de ABTS<sup>•+</sup>.

As mudanças nas absorvâncias das amostras foram acompanhadas a 734 nm em espectrofotômetro (DU-640™, Beckman-Coulter – Brea, CA, USA). O percentual do decréscimo na absorvância foi medido e a capacidade de capturar o radical ABTS<sup>•+</sup> foi calculada com base no decréscimo da absorvância observada.

Os valores da atividade antioxidante das amostras foram obtidos a partir das curvas das amostras e da curva do padrão Trolox, sendo o resultado expresso como TEAC (atividade antioxidante relativa ao Trolox) em  $\mu\text{M}$  de TE/ g de amostra.

#### 4.10.3. Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio (ORAC)

O ensaio foi realizado conforme os métodos descrito por PRIOR; HOANG; GU. (2003) e DÁVALOS *et al.* (2004). Os reagentes e diluições da fração hidrofílica do AL foram preparados no dia da análise com exceção do padrão Trolox, que foi previamente preparado e mantido sob refrigeração até o momento da análise.

As reações foram realizadas em microplacas de poliestireno, específicas para reações de fluorescência, contendo 96 compartimentos (Corning Co®, NC, USA). As leituras foram feitas utilizando leitor de microplacas NOVOstar (BMG Labtech®, Offenburg, Germany), acompanhado com o Software de análise de dados MARS Data Analysis versão 1.3 (BMG Labtech®, Offenburg, Germany).

Em balões volumétricos de 25 mL foram preparadas soluções de 160 mg/mL do néctar sem suplementação e do néctar suplementado com AL em cada uma das concentrações (1, 5, 10, 15 e 30 g/L). No caso do AL preparou-se solução de 6,2

mg/mL. Todas as soluções foram agitadas em vórtex por 30 segundos e levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos, a 10°C. Após essa etapa de extração, as soluções foram centrifugadas por 5 minutos, a 5.000 rpm e 5°C. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos e as soluções foram diluídas em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, em sete concentrações (140, 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mg/mL). A amostra de AL também foi diluída em sete concentrações (5,4; 4,6; 3,8; 3,0; 2,2; 1,4 e 0,6 mg/mL).

O padrão Trolox, na concentração de 1500  $\mu$ M, foi diluído em tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4 em sete concentrações (1000, 800, 600, 400, 200, 100 e 50  $\mu$ mol/L), para a confecção da curva-padrão do ensaio.

O sistema de reação em cada poço da microplaca foi composto por 20  $\mu$ L de amostra, 120  $\mu$ L de solução de fluoresceína (preparada na concentração de 0,00378 mg/mL e mantida ao abrigo da luz até o momento do uso) e 60  $\mu$ L de AAPH (preparado na concentração de 108 mg/mL em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, momentos antes do início da leitura da microplaca) a temperatura constante de 37°C, durante 80 minutos. A intensidade de fluorescência (485 nm<sub>Ex</sub>/520 nm<sub>Em</sub>) foi verificada a cada ciclo de 60 segundos, durante 80 ciclos em leitor de microplacas. O branco da reação foi preparado conforme o procedimento descrito, com adição do tampão fosfato no lugar da amostra.

Os resultados foram expressos em mg equivalente Trolox por mL de amostra, baseados nas curvas obtidas para o padrão Trolox e nas curvas das amostras analisadas.

#### **4.11. Análises estatísticas**

Os resultados do Teste de Comparação Múltipla foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) utilizando o Teste de Dunnett a 5% de probabilidade para verificar as diferenças significativas entre as amostras.

Os resultados do Teste de Aceitação foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) de dois fatores utilizando o Teste de Médias de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos estatísticos dos testes sensoriais foram realizados utilizando o software SAS 9.1.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, 2008).

Os resultados das análises de fenóis totais, flavonoides e análises antioxidantes foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) de um fator utilizando o Teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade. Os tratamentos estatísticos dessas análises foram realizados utilizando o software SAS 9.1.2 e o programa estatístico R (ANEXO 6).

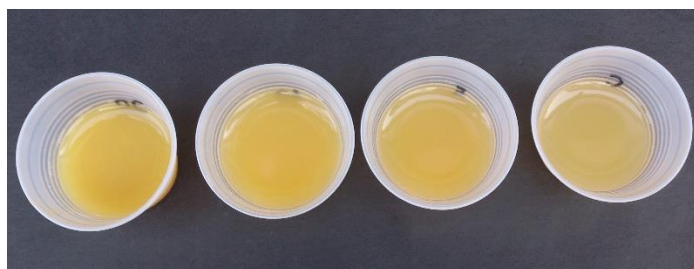


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Teste de Comparação Múltipla

O teste de comparação múltipla foi um ensaio preliminar realizado com 26 provadores, com o intuito de avaliar se os consumidores notariam a diferença sensorial entre o néctar de maçã comercial e o néctar de maçã comercial suplementado com diferentes concentrações de AL. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, a diferença sensorial foi detectada em todas as concentrações, mesmo na concentração mais baixa, de 5 g/L. Dessa forma, foi realizado o Teste de Aceitação com Escala Hedônica para checar qual(is) seria(m) esta(s) diferença(s) e para verificar se o néctar de maçã suplementado com AL teria aceitação por parte dos consumidores e qual(is) concentração(ões) do néctar suplementado com AL teria(m) maior aceitação.

Na Figura 9 é possível observar a diferença na coloração das amostras conforme a quantidade de AL adicionado aumenta (concentração de AL aumenta da direita para a esquerda).



**Figura 9.** Amostras apresentadas para os consumidores no Teste de Comparação Múltipla. Da direita para a esquerda: néctar sem suplementação, néctar suplementado com 5 g/L de AL, néctar suplementado com 10 g/L de AL e néctar suplementado com 20 g/L de AL (Fonte: arquivo pessoal)

**Tabela 3.** Comparação entre néctar de maçã puro (1) e néctar de maçã suplementado com 5 g/L (2), 10 g/L (3) e 20 g/L (4) de AL. As análises estatísticas foram feitas por ANOVA e Teste de DUNNETT.

Comparação de amostras	Diferença entre médias
4 - 1	5,85*
3 - 1	4,19*
2 - 1	2,31*

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

## 5.2. Teste de Aceitação e intenção de compra

No teste de aceitação, realizado com 112 provadores, foi verificado que o néctar de maçã comercial suplementado com 1 g/L de AL (amostra 2) foi o que apresentou melhor aceitação em relação aos parâmetros de sabor e impressão global. Esta amostra também apresentou a melhor aceitação em termos de aparência geral, cor e textura, embora sem diferença significativa para as amostras 1 (néctar sem suplementação) a 4 (néctar + 10 g/L AL), 3 (néctar + 5 g/L AL) e 4 (néctar + 10 g/L AL) e 1 (néctar sem suplementação) e 3 (néctar + 5 g/L AL), respectivamente. O néctar suplementado com 30 g/L AL (amostra 6) foi o que obteve as menores médias de aceitação em relação a todos os parâmetros avaliados, provavelmente devido à maior acidez desta amostra (Tabela 7). Em todos os casos, não houve diferença estatisticamente significativa entre o néctar sem suplementação (amostra 1) e os néctares suplementados com até 10 g/L de AL, exceto para a amostra 2 (néctar + 1g/L AL), conforme abordado anteriormente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Médias de aceitação de consumidores em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global das amostras - ANOVA e teste de médias de Tukey.

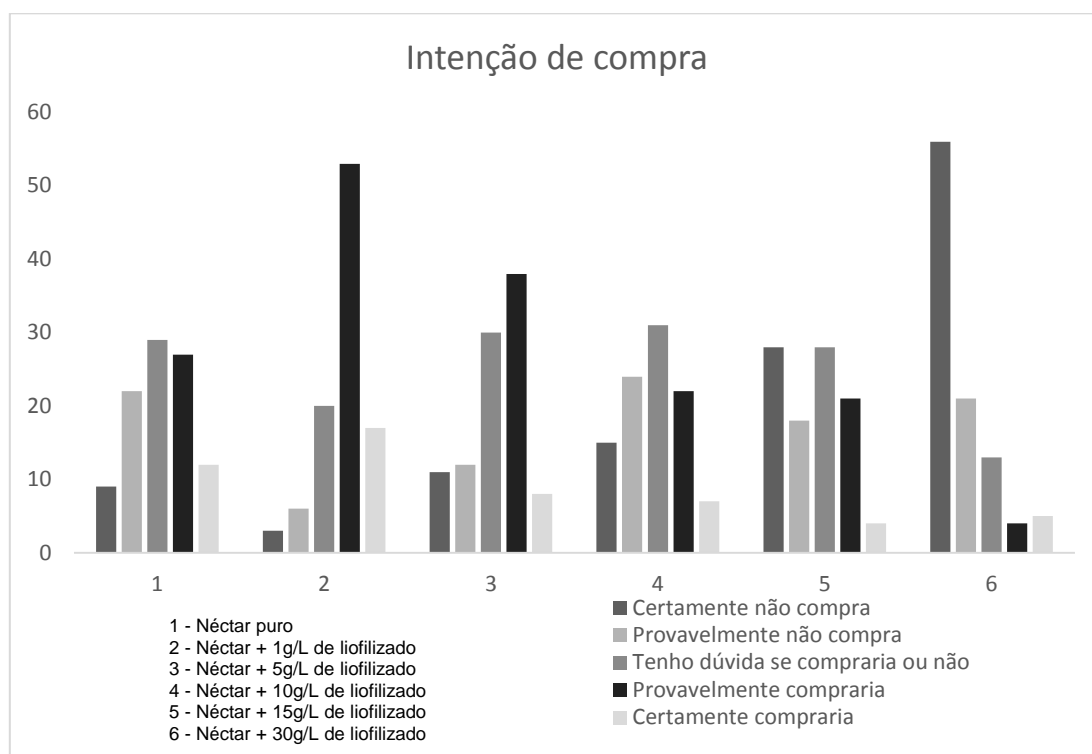
Amostra*	Aparência Geral	Cor	Sabor	Textura	Impressão Global
1	5,73 ± 1,79 <sup>ab</sup>	5,47 ± 1,92 <sup>b</sup>	5,12 ± 2,27 <sup>bc</sup>	5,88 ± 2,11 <sup>ab</sup>	5,43 ± 1,97 <sup>bc</sup>
2	6,05 ± 1,63 <sup>a</sup>	6,04 ± 1,59 <sup>a</sup>	6,13 ± 1,80 <sup>a</sup>	6,40 ± 1,69 <sup>a</sup>	6,29 ± 1,50 <sup>a</sup>
3	5,88 ± 1,82 <sup>ab</sup>	5,77 ± 1,84 <sup>ab</sup>	5,37 ± 2,16 <sup>b</sup>	5,89 ± 1,78 <sup>ab</sup>	5,66 ± 1,81 <sup>b</sup>
4	5,57 ± 1,76 <sup>ab</sup>	5,54 ± 1,84 <sup>ab</sup>	4,45 ± 2,26 <sup>cd</sup>	5,38 ± 2,16 <sup>bc</sup>	4,98 ± 1,96 <sup>cd</sup>
5	5,40 ± 2,04 <sup>b</sup>	5,38 ± 2,04 <sup>b</sup>	3,87 ± 2,42 <sup>d</sup>	5,01 ± 2,24 <sup>c</sup>	4,45 ± 2,13 <sup>d</sup>
6	4,25 ± 2,35 <sup>c</sup>	4,35 ± 2,29 <sup>c</sup>	2,52 ± 2,31 <sup>e</sup>	3,64 ± 2,35 <sup>d</sup>	3,02 ± 2,20 <sup>e</sup>

\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de AL; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de AL; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de AL; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de AL; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de AL.

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Dos 112 provadores, 99 responderam sobre a Intenção de Compra. Os resultados estão apresentados na Figura 10. A amostra 2 (néctar de maçã suplementado com 1 g/L de AL) foi a que apresentou melhor perfil de intenção de compra (maiores índices de "provavelmente compraria" e "certamente compraria"). A amostra 6 (néctar de maçã suplementado com 30 g/L de AL), por outro lado, foi a que obteve o pior desempenho em intenção de compra (maiores índices de "certamente não compraria" e menores de "provavelmente compraria" e "certamente compraria"), seguindo o que já era esperado devido aos resultados de aceitação (Tabela 3). Já as amostras 3 (néctar + 5 g/L de AL) e 4 (néctar + 10 g/L de AL) apresentaram perfil de compra próximo ao produto padrão (amostra 1 – néctar sem suplementação), de forma que os desvios "desfavoráveis" (índices maiores para "certamente não compraria", "provavelmente não compraria" e "tenho dúvidas se compraria" ou índices menores para "provavelmente compraria" e "certamente compraria") foram de quatro (amostra 3) a seis (amostra 4) pontos percentuais, enquanto que desvios "favoráveis" (índices menores para "certamente não compraria", "provavelmente não compraria" e "tenho dúvidas se compraria" ou

índices maiores para "provavelmente compraria" e "certamente compraria") chegaram a 11 pontos percentuais (amostra 3).



**Figura 10.** Gráfico da Intenção de compra.

### 5.3. Composição Centesimal

Os resultados de composição centesimal, pH, acidez total titulável e sólidos solúveis totais foram comparados com os resultados dos estudos prévios de CANUTO *et al.* (2010), ROGEZ *et al.* (2004), SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA (2008) e GARZÓN *et al.* (2012). A origem dos frutos de araçá-boi e os métodos de extração diferem entre os estudos (Tabela 5), o que pode explicar a variação muitas vezes grande nos resultados.

**Tabela 5.** Métodos de extração e região de cultivo do araçá-boi nos estudos comparados.

<b>Método de extração</b>	<b>Região de cultivo</b>	<b>Autor(es)</b>
Extração da polpa com metanol:água 8:2 (v/v) sob agitação em ultrassom, posterior filtração, lavagem com metanol. Filtrado transferido para balão volumétrico e completado com metanol:água 8:2 (v/v), centrifugado e sobrenadante congelado.	Região de Boa Vista, Roraima	CANUTO <i>et al.</i> , 2010
Extração da polpa liofilizada com metanol:água 50:50 sob agitação e posterior centrifugação. Resíduos extraídos duas vezes com acetona:água 70:30 sob agitação e posterior centrifugação. Os sobrenadantes foram reunidos e armazenados a -15°C.	Bogotá, Colômbia	CUELLAR <i>et al.</i> , 2013
Pedaços cortados do fruto foram fervidos em água, sob agitação. Alíquotas foram congeladas e antes das análises foram descongeladas e centrifugadas e os sobrenadantes utilizados.	Caquetá, Colômbia	LIZCANO <i>et al.</i> , 2010
Extração da polpa liofilizada e moída com acetona 100% seguida de três re-extrações com o mesmo solvente. Os extratos foram congelados a -20°C.	Bogotá, Colômbia	GARZÓN <i>et al.</i> , 2012
Extração da polpa com etanol aquoso (5:95 v/v, água:etanol) com posterior concentração em rotaevaporador, liofilização e pulverização e armazenamento a -20°C.	Manaus, Amazonas	NERI-NUMA <i>et al.</i> , 2013
Polpas separadas das sementes manualmente e imediatamente congeladas à -20°C em sacos plásticos. No local das análises, foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.	Belém, Pará	ROGEZ <i>et al.</i> , 2004

No presente estudo, o araçá-boi apresentou a composição centesimal apresentada na Tabela 6, que indica a composição para o AL e o respectivo valor calculado para o produto fresco, para efeito de comparação com os demais estudos.

**Tabela 6.** Composição centesimal do araçá-boi.

Análise	AL	Fruto fresco <sup>3</sup>	Base seca
Umidade <sup>1</sup>	8,21 ± 0,21	87,93 ± 0,46	-----
Cinzas	1,72 ± 0,02 <sup>2</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>2</sup>	1,87 ± 0,01
Lipídeos	1,21 ± 0,05 <sup>2</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>2</sup>	1,32 ± 0,05
Proteínas	5,31 ± 0,08 <sup>2</sup>	0,70 ± 0,03 <sup>2</sup>	5,79 ± 0,07
Carboidratos	46,96 ± 2,73 <sup>2</sup>	6,17 ± 0,84 <sup>2</sup>	51,16 ± 1,53
Fibras totais	36,59 ± 1,37 <sup>2</sup>	4,81 ± 0,33 <sup>2</sup>	39,86 ± 1,40
Fibras solúveis	9,84 ± 1,96 <sup>2</sup>	1,29 ± 0,52 <sup>2</sup>	10,72 ± 1,51
Fibras insolúveis	26,75 ± 0,59 <sup>2</sup>	3,52 ± 0,19 <sup>2</sup>	29,14 ± 0,57

<sup>1</sup> expresso como g/100 g.

<sup>2</sup> expresso como % em base úmida. Dados expressos como média de triplicata ± desvio-padrão.

<sup>3</sup> Valores expressos em base úmida, calculados considerando-se que 100 mg de fruto fresco renderam 13,15 mg de AL.

CANUTO *et al.* (2010) relataram teores de umidade e de lipídeos de, respectivamente, 90,1 g/100 g e 0,3 % na polpa (base úmida), valores próximos dos encontrados no presente estudo para o fruto fresco. Já no estudo de ROGÉZ *et al.* (2004), o teor de lipídeos não foi determinado, porém estes autores encontraram teores de proteínas, cinzas e fibras totais no araçá-boi de 11,9 %, 4 % e 39 % (base seca), respectivamente, valores maiores do que os encontrados no presente estudo, com exceção do teor de fibras totais, que ficou próximo.

A constituição física e química do fruto é determinada pelo efeito integrado de muitos fatores, como a variedade, porta-enxerto, clima, solo, altitude, adubações, tratamentos culturais, irrigação, doenças, poda, produtividade, danos mecânicos, idade da árvore, posição e estágio de maturação do fruto (NASCIMENTO, 2008).

#### 5.4. Determinação de pH

A determinação do pH é de grande relevância devido a vários fatores, tais como desenvolvimento de micro-organismos, influência na palatabilidade, emprego de esterilização e escolha de embalagem que será utilizada para o alimento (GOUVEIA *et al.*, 2004)

Para as amostras do néctar de maçã comercial e do néctar de maçã comercial suplementado com diferentes concentrações de AL, observa-se que o pH diminui conforme a concentração de AL adicionado ao néctar aumenta (Tabela 7), o que é esperado devido à elevada acidez do AL (Tabela 8).

**Tabela 7.** Valores de pH do néctar, do néctar enriquecido com o AL nas diferentes concentrações e do AL reconstituído.

Amostra	pH
Néctar	3,18 ± 0,00
Néctar + 1g/L	3,09 ± 0,00
Néctar + 5 g/L	3,00 ± 0,00
Néctar + 10 g/L	2,95 ± 0,02
Néctar + 15 g/L	2,90 ± 0,02
Néctar + 30 g/L	2,84 ± 0,01
AL reconstituído	2,57 ± 0,01

Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

O pH do AL reconstituído obtido nesse estudo foi de 2,57, enquanto que o pH encontrado no estudo de SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA (2008), para a polpa de araçá-boi, foi 2,28. No estudo de CANUTO *et al.* (2010), o pH da polpa do araçá-boi foi 4,0. Já em ROGEEZ *et al.* (2004) o pH encontrado foi 2,6, próximo do valor obtido para o AL reconstituído nesse estudo, sendo que ambos os estudos realizaram a liofilização do fruto.

As diferenças de pH encontradas ao se comparar os estudos se devem aos fatores já citados no item anterior (5.3). As características físicas, assim como os principais aspectos físico-químicos dos frutos, podem variar em função do local de cultivo e da variabilidade dos materiais (NASCIMENTO, 2008).

### 5.5. Determinação da Acidez Total Titulável (ATT)

A acidez é um importante parâmetro na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício (MONÇÃO *et al.*, 2010). Ela é dada pela presença dos ácidos orgânicos. O teor de ácidos orgânicos tende a diminuir durante o processo de maturação, devido à oxidação dos ácidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, em decorrência da respiração. Assim, a variação da acidez pode ser um indicativo do estágio de maturação do fruto, já que a acidez decresce em função do avanço da maturação (NASCIMENTO, 2008).

O ácido orgânico predominante no araçá-boi é o ácido málico (HERNANDEZ *et al.*, 2007). Entretanto alguns estudos reportam a acidez total titulável do araçá-boi em relação ao ácido cítrico.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 8, observou-se que o AL reconstituído apresentou elevada acidez e que a acidez do néctar de maçã aumentou conforme mais AL foi adicionado ao mesmo. Isso é esperado devido à alta acidez da polpa do araçá-boi.

No estudo de CANUTO *et al.* (2010), o valor da ATT obtido para a polpa de araçá-boi foi de 1,8 g de ácido cítrico/100 g (polpa, base úmida). Já no estudo de SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA (2008) o valor obtido para a polpa de araçá-boi foi de 2,38 g de ácido cítrico/100 g. No estudo de GARZÓN *et al.* (2012) o valor obtido foi de 2,83 g de ácido málico/100 g de amostra (polpa e casca, base úmida). Os valores obtidos no presente estudo para o AL reconstituído foram 55,43 mL de NaOH 0,1 M/100 g, 3,55 mg de ácido cítrico/g ou ainda 3,73 mg de ácido málico/g de AL reconstituído, o que indica uma acidez um pouco mais elevada que os frutos dos demais estudos citados. Já a acidez encontrada para o néctar, de 0,24 g de ácido cítrico equivalente por 100 g (ou 0,26 g de ácido málico equivalente por 100 g) está próximo do valor encontrado no estudo de IHA *et al.* (2006), o qual obteve um valor de 0,28 g de ácido málico equivalente por 100 g para néctares de maçã.



**Tabela 8.** Valores da acidez total titulável determinados para o néctar, néctar enriquecido com AL nas diferentes concentrações e AL reconstituído.

Amostra	Acidez Total <sup>1</sup>	Acidez Total <sup>2</sup>	Acidez Total <sup>3</sup>
Néctar	3,81 ± 0,05	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Néctar + 1 g/L	4,13 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,00
Néctar + 5 g/L	5,60 ± 0,02	0,36 ± 0,00	0,38 ± 0,01
Néctar + 10 g/L	7,17 ± 0,06	0,46 ± 0,00	0,48 ± 0,00
Néctar + 15 g/L	9,39 ± 0,11	0,61 ± 0,01	0,63 ± 0,01
Néctar + 30 g/L	17,75 ± 1,15	1,14 ± 0,08	1,19 ± 0,08
AL reconstituído	55,43 ± 1,24	3,55 ± 0,08	3,73 ± 0,06

<sup>1</sup> expresso como mL de NaOH 0,1 M/100 g de amostra (base úmida). Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

<sup>2</sup> expresso como g de ácido cítrico/100 g de amostra (base úmida). Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

<sup>3</sup> expresso como g de ácido málico/100 g de amostra (base úmida). Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

## 5.6. Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os sólidos solúveis totais, cuja medida é geralmente indicada em °Brix, constitui uma importante característica sensorial que representa uma medida da concentração de açúcares e outros sólidos diluídos na polpa ou suco do fruto, sendo um parâmetro fundamental para a avaliação de qualidade (LEÃO *et al.*, 2006). É um parâmetro importante tanto para frutos consumidos *in natura* como para o processamento industrial, uma vez que elevados teores desses constituintes na matéria-prima implicam menor adição de açúcares, menor tempo de evaporação da água, menor gasto de energia e maior rendimento do produto, resultando em maior economia no processamento (SILVA; SILVA; SILVA, 2002).

O valor de SST obtido para o AL reconstituído foi de 7,54 g/100 g (polpa e casca, base úmida), maior que os valores obtidos por CANUTO *et al.* (2010) e GARZÓN *et al.* (2012) os quais foram de 4,5 g/100 g (polpa, base úmida) e 4,6 g/100 g (polpa e casca, base úmida), respectivamente, porém menor que o valor encontrado no estudo de SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA (2008) o qual foi de 11,66 g/100 g de polpa.

As diferenças entre os resultados dos estudos podem ser explicadas novamente pelas razões descritas no item 5.3. além do fato (também já citado) do araçá-boi nesse estudo ter sido liofilizado e depois reconstituído em água para a análise de SST, sendo que diferenças nos resultados podem ser esperadas.

Para as amostras do néctar de maçã suplementado com AL obteve-se um aumento discreto no valor de SST conforme a concentração de AL adicionada ao néctar aumentou (Tabela 9), uma observação condizente com o esperado. Já a relação SST/acidez diminuiu conforme o nível de suplementação aumentou (Tabela 9), o que pode ser explicado pela elevada acidez do AL (Tabela 8). Tal fato pode explicar a menor aceitação dos néctares suplementados com mais de 10 g/L de AL (Tabela 4, Figura 10).

A relação entre SST e ATT fornece um indicativo do sabor do fruto, pois relaciona a quantidade de açúcares e ácidos presentes. Essa relação tende a aumentar durante o amadurecimento do fruto, devido ao aumento nos teores de açúcares e à diminuição dos ácidos. Dessa forma, todos os fatores, sejam eles ambientais ou fisiológicos, que interferem no metabolismo dos açúcares e ácidos, interferem na relação SST/ATT e, conseqüentemente, no sabor do fruto (NASCIMENTO, 2008).

**Tabela 9.** Valores de Sólidos Solúveis Totais determinados para o néctar, néctar enriquecido com AL nas diferentes concentrações e AL reconstituído.

Amostra	Sólidos Solúveis Totais <sup>1</sup>	Relação SST/ATT <sup>2</sup>
Néctar	10,53 ± 0,14	40,50 ± 2,10
Néctar + 1 g/L	10,61 ± 0,25	37,89 ± 0,90
Néctar + 5 g/L	10,61 ± 0,25	27,92 ± 1,40
Néctar + 10 g/L	11,11 ± 0,25	23,15 ± 0,52
Néctar + 15 g/L	11,25 ± 0,25	17,86 ± 0,68
Néctar + 30 g/L	11,61 ± 0,25	9,76 ± 0,87
AL reconstituído	7,54 ± 0,25	2,02 ± 0,10

<sup>1</sup> expresso como °Brix ou g/100 g de amostra. Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

<sup>2</sup> expresso como g SST/ g de ácido málico equivalente.

### 5.7. Determinação de Vitamina C

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel, com elevada instabilidade e facilmente oxidável, podendo degradar-se prontamente. Uma das funções básicas e conhecidas do ácido ascórbico é a efetividade na doação elétrons, onde se destaca na aceleração de reações de hidroxilação (como na formação do colágeno), na regulação do sistema nervoso humano através da ação no metabolismo da tirosina, do ácido fólico e do triptofano. O ácido ascórbico também tem papel de elevada relevância no crescimento de tecidos e processos de cicatrização de feridas, na formação de neurotransmissores e no aumento da absorção de ferro ao nível dos intestinos. Sua principal função é como antioxidante, agindo como sequestrante de espécies reativas de oxigênio como: hidroxil, peroxil, peroxinitrito, superóxido e oxigênio singlete, formando compostos menos reativos, e deste modo protegendo as células de danos ocasionados pelos radicais livres (FERREIRA, 2015).

Mais de 85% da vitamina C é proporcionada por frutas e hortaliças e por isso é considerada o antioxidante hidrossolúvel mais importante no organismo. A vitamina C possui a capacidade de eliminar diferentes espécies de radicais livres, tais como os radicais superóxido e hidroxil, além de reduzir radicais tocoferóis de volta para a forma ativa nas membranas celulares, mantendo a sua integridade em células dos organismos aeróbios. Estudos indicam que o ácido ascórbico pode prevenir mutações em DNA de humanos, uma vez que altas concentrações do ácido reduzem mutações causadas por estresse oxidativo em células humanas *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O método de Tillmans, utilizado para a determinação de vitamina C no presente estudo, constitui uma técnica de fácil aplicação e baixo custo, principalmente quando comparada à técnica cromatográfica. O uso do DCFI é frequente, tanto para a análise de produtos alimentícios quanto para produtos farmacêuticos, além de ser utilizado como base de comparação para novas metodologias (JERÔNIMO, 2012). O principal problema da determinação de vitamina C pelo método de Tillmans se deve ao fato de que o ácido ascórbico pode ser oxidado para ácido deidroascórbico, que é fisiologicamente ativo mas não reage com o reagente da titulação. Enquanto que a oxidação do ácido

ascórbico é reversível, o ácido deidroascórbico é instável e sofre nova decomposição irreversível (FERREIRA, 2015). Além disso, o método de Tillmans sofre interferência de ferro, estanho, cobre, sulfito e tiosulfato (JERÔNIMO, 2012), o que pode levar à superestimativas do valor.

Na determinação de vitamina C do AL reconstituído obteve-se valor de 3,73 mg/100 mL (polpa e casca, base úmida) (Tabela 10). Já nos estudos de CANUTO *et al.* (2010) (no qual foi utilizado o mesmo método de determinação através de titulação com o reagente DCFI) e SACRAMENTO; BARRETTO; FARIA (2008) na análise da polpa do araçá-boi, foram encontrados valores menores de vitamina C, 0,2 mg/100 g de polpa (base úmida) e 0,53 mg/100 g de polpa (base úmida), respectivamente.

Assim como nas demais análises físico-químicas, as diferenças entre os resultados dos estudos podem ser devido às razões descritas no item 5.3. Ainda, o valor superior de ácido ascórbico obtido para o AL reconstituído no presente estudo pode estar relacionado à interferentes que levam a superestimativas do valor na determinação de vitamina C pelo método de Tillmans.

A vitamina C é utilizada como conservante no néctar de maçã avaliado (adição durante a produção do néctar). O teor de vitamina C encontrado para o néctar, de 24,11 mg/100 mL (Tabela 10), foi cerca de 50% superior ao relatado no rótulo do produto, o qual indica um valor de 32 mg/ 200 mL de néctar ou 16 mg/100 mL de néctar.

Os néctares de maçã suplementados com AL tiveram um incremento teórico pouco significativo em termos de vitamina C, aumentando menos de 5% com as suplementações (Tabela 10). Isso pode ser resultado do teor de ácido ascórbico ser muito maior no néctar do que no AL reconstituído.

**Tabela 10.** Valores de concentração de vitamina C determinados para o néctar e para o AL reconstituído e calculado para os néctares suplementados com AL.

Amostra	[Ácido Ascórbico] <sup>1</sup>
Néctar	24,11 ± 0,09
Néctar + 1 g/L <sup>2</sup>	24,14 ± 0,10
Néctar + 5 g/L <sup>2</sup>	24,25 ± 0,11
Néctar + 10 g/L <sup>2</sup>	24,39 ± 0,13
Néctar + 15 g/L <sup>2</sup>	24,53 ± 0,15
Néctar + 30 g/L <sup>2</sup>	24,95 ± 0,21
AL reconstituído <sup>3</sup>	3,73 ± 0,37

<sup>1</sup> expresso como mg/100 mL de amostra. Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

<sup>2</sup> valores calculados a partir dos dados obtidos para o néctar e para o AL reconstituído, conforme explicação no item 4.5.4.

<sup>3</sup> reconstituído com base na umidade do fruto fresco, conforme explicado no item 4.3.

### 5.8. Determinação de Fenóis Totais e Flavonoides Totais

Devido às suas propriedades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante, os compostos fenólicos tem recebido muita atenção e grande esforço tem sido feito para caracterizar e quantificar os fenóis em diferentes tecidos de plantas (IGNAT; VOLF; POPA, 2011; RODRIGUEZ-MATEOS *et al.*, 2014). Os métodos espectrofotométricos utilizados para a determinação de compostos fenólicos e flavonoides constituem métodos simples, rápidos e seletivos (PEÑARRIETA *et al.*, 2007).

Os resultados de Fenóis Totais e Flavonoides Totais foram comparados com os resultados dos estudos prévios de NERI-NUMA *et al.* (2013), GARZÓN *et al.* (2012) e LIZCANO *et al.* (2010).

A concentração de fenóis totais obtida para o AL nesse estudo foi de 75,56 mg EAG/100 g (Tabela 11), o que equivale a 10,01 mg EAG/100 g de fruto fresco (polpa e casca, base úmida), com umidade de 87,93% (Tabela 6). No trabalho de GARZÓN *et al.* (2012) a concentração de fenóis totais encontrada foi de 34,1 mg EAG/100 g (polpa e casca, base úmida) e no estudo de LIZCANO *et al.* (2010), a

concentração obtida foi muito maior, 157 mg EAG/100 g (fruto, base úmida). Já no estudo de NERI-NUMA *et al.* (2013) a quantidade de fenóis totais encontrada foi de 184,05 mg EAG/100 g (polpa e casca, base seca).

As variações, muitas vezes grandes, entre os resultados dos diferentes estudos, além de estarem relacionadas com as razões descritas no item 5.3., podem também ser explicadas pelas diferenças no preparo/extração das amostras (tabela 5).

Nas amostras de néctar e néctar suplementado com diferentes concentrações de AL, foi observado que, em geral, quanto maior a quantidade de AL suplementado, maior o teor de fenóis totais e flavonoides. Porém, não houve diferença significativa entre a concentração de fenóis totais do néctar sem suplementação e do néctar suplementado com 1 g/L de AL, o qual obteve maior aceitação na análise sensorial. Também não houve diferença significativa entre as concentrações de fenóis totais das amostras do néctar suplementado com 5 g/L de AL e do néctar suplementado com 10 g/L de AL, bem como não houve diferença significativa entre as concentrações de fenóis totais das amostras do néctar suplementado com 10 g/L de AL e do néctar suplementado com 15 g/L de AL. Por fim, a amostra de néctar suplementado com a maior concentração de AL, 30 g/L, obteve concentração de fenóis totais significativamente maior do que todas as demais amostras analisadas (Tabela 11). Entretanto, esta também foi a amostra de menor aceitação (Tabela 4).

No caso da análise de flavonoides totais, a concentração obtida nesse estudo para o AL foi de 83,33 mg ECAT/100 g, o que equivale a 11,04 mg ECAT/100 g de fruto fresco (polpa e casca, base úmida) com 87,93% umidade, enquanto que no trabalho de LIZCANO *et al.* (2010), a concentração obtida para o araçá-boi foi de 5 mg ECAT/100 g (fruto, base úmida). Uma possível explicação para essa diferença estaria, além das razões descritas no item 5.3, no preparo/extração da amostra (tabela 5). Enquanto que no presente estudo a polpa e casca do araçá-boi foram prontamente liofilizadas após separação das sementes, no trabalho de LIZCANO *et al.* (2010) o fruto passou por fervura em água, o que pode ter levado à perda de flavonoides.

Entre as amostras de néctar e néctares suplementados, as concentrações de flavonoides não apresentaram grandes diferenças. A maior delas, observadas para os néctares suplementados com 30 g/L de AL e 5 g/L de AL, não diferiram estatisticamente das amostras de néctares suplementados com 15 g/L de AL e 1 g/L de AL, as quais também não diferiram significativamente da amostra de néctar suplementado com 10 g/L de AL. Já a amostra de néctar não suplementado apresentou teor de flavonoides significativamente menor que todas as demais (Tabela 11).

**Tabela 11.** Resultados das análises de fenóis totais e flavonoides do néctar, do néctar enriquecido com AL nas diferentes concentrações e do AL.

<b>Amostra</b>	<b>Fenóis Totais<sup>1</sup></b>	<b>Flavonóides<sup>2</sup></b>
Néctar	2,841 ± 0,088 <sup>e</sup>	8,563 ± 0,248 <sup>c</sup>
Néctar + 1 g/L AL	2,960 ± 0,059 <sup>de</sup>	10,90 ± 0,41 <sup>ab</sup>
Néctar + 5 g/L AL	3,079 ± 0,059 <sup>cd</sup>	11,57 ± 0,51 <sup>a</sup>
Néctar + 10 g/L AL	3,187 ± 0,049 <sup>bc</sup>	10,10 ± 0,53 <sup>b</sup>
Néctar + 15 g/L AL	3,272 ± 0,055 <sup>b</sup>	11,01 ± 0,26 <sup>ab</sup>
Néctar + 30 g/L AL	4,213 ± 0,086 <sup>a</sup>	11,69 ± 0,69 <sup>a</sup>
AL	75,56 ± 5,79	83,33 ± 0,13

<sup>1</sup> expresso como mg EAG/100 g de AL.

<sup>2</sup> expresso como mg ECAT/100 g de AL.

Dados expressos como média de triplicata ± desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05).

## 5.9. Determinação da atividade antioxidante

Os testes de determinação da atividade antioxidante *in vitro* têm se tornado importantes ferramentas que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo. Estes testes têm demonstrado a importância de dietas ricas em frutas e vegetais, comprovando a presença de substâncias antioxidantes, as quais auxiliam no combate aos radicais livres (ALVES; DAVID, 2010).

Os resultados de atividade antioxidante por DPPH, ABTS e ORAC foram comparados com os resultados dos estudos prévios de CANUTO *et al.* (2010), NERI-NUMA *et al.* (2013), GARZÓN *et al.* (2012) e LIZCANO *et al.* (2010).

Nas análises de TEAC utilizando ABTS foi encontrada uma capacidade antioxidante para o AL de 11,19 mg ET/g (Tabela 12), o que equivale a 1,48 mg ET/g de fruto fresco (polpa e casca, base úmida) com 87,93% umidade. No trabalho de GARZÓN *et al.* (2012), o valor obtido para o araçá-boi foi de 0,65 mg ET/g (ou 2,6  $\mu$ mol ET/g) (polpa e casca, base úmida), valor que corresponde a praticamente a metade do obtido para o fruto fresco nesse estudo. No estudo de CANUTO *et al.* (2010), o valor obtido foi de 0,75 mg ET/g (ou 3,0  $\mu$ mol ET/g) (polpa, base úmida), valor que é pouco mais da metade do obtido no presente estudo. Já no trabalho de LIZCANO *et al.* (2010), o valor obtido para o araçá-boi foi de 1,4 mg ET/g (ou 5,5  $\mu$ mol ET/g) (fruto, base úmida), valor próximo ao obtido no presente estudo.

Nas análises de DPPH, a atividade antioxidante encontrada nesse estudo para o AL foi de 7,030 mg ET/g (Tabela 12), o que equivale a 0,931 mg ET/g de fruto fresco (polpa e casca, base úmida) com 87,93% umidade, enquanto que no estudo de GARZÓN *et al.* (2012) o valor encontrado foi cerca de 40% inferior, 0,50 mg ET/g (ou 2,0  $\mu$ mol ET/g) (polpa e casca, base úmida).

Nas análises de ORAC, foi obtido para o AL o valor de 124,2  $\mu$ mol ET/g (Tabela 12), o que equivale a 16,46  $\mu$ mol ET/g de fruto fresco (base úmida) com 87,93% umidade, cerca de 24% maior do que o encontrado para a polpa de araçá-boi no trabalho de LIZCANO *et al.* (2010), o qual foi de 12,1  $\mu$ mol ET/g (fruto, base úmida). No estudo de NERI-NUMA *et al.* (2013), o valor de ORAC obtido foi de 3,72  $\mu$ mol ET/g (casca e polpa, base úmida) (cerca de quatro vezes menor que o encontrado neste estudo).

Mais uma vez, as diferenças entre os resultados das análises de determinação da capacidade antioxidante podem ser explicadas pelas razões descritas no item 5.3. além da utilização de diferentes métodos de preparo/extração em cada estudo (tabela 5).



Em relação ao néctar suplementado com AL, de forma geral, quanto maior a quantidade de AL adicionado ao néctar, maior foi a capacidade antioxidante evidenciada pelos diferentes métodos, embora algumas dessas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas.

No caso do teste de DPPH, a maior capacidade antioxidante foi evidenciada para o néctar suplementado com 30 g/L de AL. Capacidade antioxidante significativamente menor foi observada para os néctares suplementados com 15 g/L de AL e 10 g/L de AL, cujos valores não diferiram significativamente entre si. As menores capacidades antioxidantes foram observadas para os néctares sem suplementação e suplementados com 1 g/L de AL e 5 g/L de AL, cujos valores não diferiram significativamente entre si (Tabela 12).

No caso da capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS, o maior resultado foi evidenciado para o néctar suplementado com 30 g/L de AL. Uma capacidade antioxidante significativamente menor foi observada para os néctares suplementados com 15 g/L de AL e 10 g/L de AL, cujos valores não diferiram significativamente entre si. Capacidade antioxidante ainda menor foi observada para os néctares suplementados com 1 g/L de AL e 5 g/L de AL, cujos valores não diferiram significativamente entre si. Já a menor capacidade antioxidante, significativamente menor que às demais, foi observada para o néctar sem suplementação (Tabela 12).

Para os ensaios antioxidantes pelo método ORAC, os maiores valores de capacidade antioxidante foram identificados para os néctares suplementados com 30 g/L, 15 g/L, 10 g/L e 5 g/L de AL, cujos valores não diferiram significativamente entre si. Os néctares sem suplementação ou suplementados com 5 g/L e 10 g/L de AL também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Já as menores atividades foram observadas para os néctares sem suplementação e para os néctares suplementados com 1 g/L de AL ou 5 g/L de AL, cujos valores não diferiram significativamente entre si (Tabela 12).

**Tabela 12.** Resultados das Análises de DPPH, ABTS e ORAC do néctar, do néctar suplementado com o AL nas diferentes concentrações e do AL.

Amostra	DPPH <sup>1</sup>	ABTS <sup>1</sup>	ORAC <sup>2</sup>
Néctar	0,2710 ± 0,0401 <sup>c</sup>	0,4650 ± 0,0061 <sup>d</sup>	6,279 ± 0,569 <sup>bc</sup>
Néctar + 1 g/L	0,2392 ± 0,0065 <sup>c</sup>	0,5623 ± 0,0058 <sup>c</sup>	5,461 ± 0,182 <sup>c</sup>
Néctar + 5 g/L	0,2655 ± 0,0147 <sup>c</sup>	0,5451 ± 0,0050 <sup>c</sup>	7,367 ± 0,620 <sup>abc</sup>
Néctar + 10 g/L	0,3431 ± 0,0063 <sup>b</sup>	0,6522 ± 0,0163 <sup>b</sup>	7,397 ± 0,330 <sup>ab</sup>
Néctar + 15 g/L	0,3580 ± 0,0253 <sup>b</sup>	0,6449 ± 0,0062 <sup>b</sup>	8,841 ± 0,423 <sup>a</sup>
Néctar + 30 g/L	0,4420 ± 0,0118 <sup>a</sup>	0,8258 ± 0,0244 <sup>a</sup>	9,235 ± 0,660 <sup>a</sup>
AL	7,030 ± 0,097	11,19 ± 0,07	124,2 ± 2,2

<sup>1</sup> expresso em mg ET/ g de AL;

<sup>2</sup> expresso em µmol ET/ g de AL.

Dados expressos como média de triplicata ± desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05).

## 6. CONCLUSÃO

Os frutos de araçá-boi analisados nesse estudo são provenientes de Ituberá, Bahia, sendo que foram comparados com frutos de araçá-boi provenientes de diferentes localidades da Colômbia e de diferentes localidades da região norte do Brasil. Dessa forma, as diferenças na composição centesimal, pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e teor de vitamina C entre os estudos comparados podem ser em parte explicadas pelos diferentes tipos de solo, clima, irrigação, entre outros.

A amostra de néctar de maçã suplementado com 1 g/L de AL obteve a melhor aceitação entre todas as amostras analisadas no Teste de Aceitação e Intenção de Compra. Entretanto, nas análises de determinação de fenóis totais e análises antioxidantes por DPPH e ORAC, não houve diferença significativa entre a amostra de néctar de maçã suplementado com 1 g/L de AL e a amostra de néctar de maçã sem suplementação. Entretanto, é possível observar que os valores de flavonoides e de atividade antioxidante por ABTS apresentaram aumento significativo em relação ao néctar não suplementado.

Considerando o objetivo de aumentar significativamente o teor de fenólicos e a capacidade antioxidante do néctar comercial, observou-se que o néctar suplementado com 10 g/L de AL apresentou valores significativamente maiores que o néctar não suplementado para todos os ensaios efetuados, exceto para o método ORAC, cujo valor obtido não diferiu significativamente do néctar sem suplementação, embora também não tenha diferido significativamente do maior valor observado para os néctares considerados neste estudo. Contudo, mesmo com incremento em fenólicos e capacidade antioxidante, este néctar suplementado com 10 g/L de AL não apresentou diferença significativa no teste sensorial e sua intenção de compra foi compatível com o produto padrão (sem suplementação). Isso demonstra que é possível elevar a qualidade nutricional deste néctar sem interferir com os aspectos sensoriais do mesmo.

Os sucos ou néctares de frutas são considerados como saudáveis e constituem um bom meio de fortificação. Por essa razão, eles representam uma grande oportunidade para adicionar ingredientes funcionais que aumentam o apelo

aos consumidores. Ainda, a suplementação com extratos de frutas exóticas e que apresentam potencial funcional, é interessante e possibilita ao consumidor conhecer novos sabores além de viabilizar a produção dessas frutas em maior escala e favorecer o desenvolvimento econômico da agroindústria.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No presente estudo, demonstramos que a adição de AL ao néctar de maçã possibilitou um incremento nas propriedades antioxidantes (a partir de 10 g/L) e também uma melhor aceitação (1 g/L). Porém, esta suplementação foi acompanhada por uma elevação na acidez (e redução no pH) e no teor de SST, de forma que a relação SST/acidez caiu conforme o nível de suplementação aumentou. Dessa forma, suplementações de AL maiores ou iguais a 15 g/L não tiveram uma boa aceitação sensorial. Portanto, houve um nível intermediário de suplementação considerado ideal (10 g/L) para o qual se evidenciou incremento nas propriedades antioxidantes sem influência significativa na aceitação sensorial, quando comparado ao produto padrão (néctar sem suplementação).

Dessa forma, considerando que a adição de AL em alimentos pode melhorar o perfil nutricional de produtos sem prejudicar o sensorial, sugere-se, em trabalhos futuros, identificar os principais compostos fenólicos presentes na polpa do araçá-boi por meio de técnicas como CLAE-DAD ou CLUE-ESI-EM/EM além de identificar e quantificar os oligossacarídeos presentes nesta fruta. Sugere-se também trabalho semelhante a esse utilizando outras frutas ou mesmo utilizando a suplementação com o araçá-boi liofilizado em outros produtos como o iogurte, por exemplo, que por ser um produto no qual se espera uma acidez maior poderia ser obtida melhor aceitação com a suplementação, adicionado ao fato de que sua atividade antioxidante reconhecidamente menor que a dos néctares poderia ter um o incremento muito mais significativo com a suplementação de AL.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013;

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M. Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010;

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ESIN ÇELİK, S.; BEKTASOĞLU, B.; ISIL BERKER, K.; ÖZYURT, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12, p.1496-1547, 2007;

APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S.E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 413– 419, 2008;

Association of Official Analytical Chemists (AOAC): Official Methods of Analysis. Washington (USA), 19<sup>a</sup> edição, 2012;

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 15–27, 1999;

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958;

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.V.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995;

BUAINAIN, A.M; BATALHA, M.O. Cadeia produtiva de frutas/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura- Brasília: IICA:MAPA/SPA, 2007. 102p. ISBN 978-85-99851-19-7;

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 32, n. 4, 2010;

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CULTER, R.G. Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidant free radicals. **Biology and Medicine**, v. 14, p. 303–311, 1993;

CHIARELLO, M.D. **Revista de Parcerias Estratégicas**, Brasília, 15:45-60, 2002;

CROZIER, A., JAGANATH, I.B., CLIFFORD, M.N. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing, 2006. pp. 1-24. ISBN 1405125098;

CUELLAR, F. A.; ARIZA, E.; ANZOLA, C.; RESTREPO, P. Estudio de la capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh) durante la maduración. **Revista Colombiana de Química**, v. 42, n. 2, 2013;

Cultivo do araçá-boi, INPA, CPCA. Disponível em: <https://www.inpa.gov.br/cpca/areas/araca.html> (acesso em agosto de 2015);

DAMETTO, A. C. Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae). Araraquara, 2014, 169p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química;

DÁVALOS, A.; MIGUEL, M.; BARTOLOME, B.; LOPEZ–FANDINO, R.; Antioxidant activity of peptides derived from egg white roteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1939-1944, 2004;

DAVID, S.B. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radical Research**, v. 31 (6), p. 577–596, 1999;

DEL RIO, D.; COSTA, L.G.; LEAN, M.E.J; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 1-6, 2010;

DINIS, T.C.P.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, p. 161–169, 1994;.

DUTCOSKY, S. Análise Sensorial de Alimentos. Ed. Champagnat, 3 ed., 2011;

FERREIRA, R. L. Avaliação dos processos de secagem e de extração de compostos antioxidantes em farinha de resíduos de frutas e hortaliças. Rio de Janeiro, 2015, 115p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade

Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição;

FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring antioxidant capacity of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1035–1040, 1999;

FORTITECH. Disponível em: [http://www.fortitech.com/wpcontent/uploads/2013/02/Functional\\_Beverages\\_FINAL\\_PORT.pdf](http://www.fortitech.com/wpcontent/uploads/2013/02/Functional_Beverages_FINAL_PORT.pdf). (acesso em outubro de 2015);

FOTI, M.C. Use and Abuse of the DPPH• Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 8765-8776, 2015;

FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I.; GALLEANO, M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 931-934, 2014;

FREI, B.; STOCKER, R.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate the most effective antioxidant in human blood plasma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 264, p. 155–163, 1990;

GARZÓN, G. A.; NARVÁEZ-CUENCA, C. E.; KOPEC, R. E.; BARRY, A. M.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60 (18), p. 4709-4717, 2012;

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends in Pharmacological Science**, v. 26, n. 4, p. 190-195, 2005;

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; MAIANI, G.; AZZINI, E.; FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 29–36, 1995;

GLAZER, A. N. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. **Faseb Journal**, v. 2, p. 2487-2491, 1988;

GOMES, C.A., CRUZ, T.G., ANDRADE, J.L., MILHAZES, N., BORGES, F., MARQUES, M.P.M. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure–activity study. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5395–5401, 2003;

GONÇALVES, A. E. S. S., LAJOLO, F. M., & GENOVESE, M. I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian

native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010;

GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; MEDEIROS, B. G. S.; RIBEIRO, C. F. A.; DUARTE, S. M. A. Determinação de características físico-químicas da goiaba: goiabeiras adubadas no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 1, p. 35-38, 2004;

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012;

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives Biochemistry Biophysics**, 476:107–12, 2008;

HERNÁNDEZ, M. S.; BARRERA, J.; MARTÍNEZ, O.; FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P. Postharvest quality of arazá fruit during low temperature storage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 879-884, 2009;

IGNAT, I., VOLF, I. & POPA, V.I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 126, 1821–1835, 2011;

IHA, M.H.; CASTRO, S.C.; RIBEIRO, E.G.A.; ANDRADE, R.O.; SABINO, M. Avaliação físico-química e microbiológica de suco e néctares de maçã comercializados em cidades do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, 2006;

IKEDA, A.A.; MORAES, A.; MESQUITA, G. **Journal of Biosciences**, v. 27, p. 703-714, 2002;

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Métodos físico-químicos para análises de alimentos, 4.ed., São Paulo, 1020p, 2008;

ISMAIL, A.; MARJAN, Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, p. 581-586, 2004;

JAYAPRAKASH, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1018–1022, 2001;

JERÔNIMO, M. Validação e cálculo da incerteza de métodos clássicos: titulométricos e espectrofotométricos utilizados na determinação de ácido ascórbico. Araraquara, 2012, 196p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade



Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas;

JONES, P. J.; JEW, S. Functional food development: Concept to reality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 387–390, 2007;

KABOUCHE, A.; KABOUCHE, Z.; ÔZTURK, M.; KOLAL, U.; TOPÇU, G. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1281–1287, 2007.

KIKUZAKI, H.; USUGUCHI, J.; NAKATANI, N. Constituents of Zingiberaceae I. Diarylheptanoid from the rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 120, 1991;

KOOY, N.W.; ROYALL, J.A.; ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, p. 149–156, 1994;

KUNCHANDY, E.; RAO, M.N.A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 237–240, 1990;

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007;

LEÃO, D. S.; PEIXOTO, J. R.; VIEIRA, J. V. Teor de licopeno e de sólidos solúveis totais em oito cultivares de melancia. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 3, p. 7-15, 2006;

LIU, R. H. Health Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. **Advances in Nutrition, An International Review Journal**, vol, 4, p. 384-392, 2013;

LIZCANO, L. J., BAKKALI, F., RUIZ-LARREA, M. B., RUIZ-SANZ, J. I. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, v. 119, p.1566-1570, 2010;

LOTITO, S. B.; ZHANG, W.; YANG, C. S.; CROZIER, A.; FREI, B. Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 51, p. 454-463, 2011;

LÜ, J.; LIN, P.H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 840–860, 2010;

MACFIE, H. J.; N., BRATCHELL; GREENHOFF, K.; VALLIS, L. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, v. 4, n. 2, 129-148, 1989;

MANZOCCO, L., ANESE, M., NICOLI, M.C. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 31 (7–8), p. 694–698, 1998;

MARCOCCI, I.; MARGUIRE, J.J.; DROY-LEFAIZ, M.T.; PACKER, L. The nitric oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, p. 748–755, 1994;

MARLETTA, M. A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, p. 488-492, 1989;

MARTINEZ-PEREZ, C.; WARD, C.; COOK, G.; MULLEN, P.; MCPHAIL, D.; HARRISON, D. J.; LANGDON, S. P. Novel Flavonoids as anti-cancer agents: mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 42 (4), p. 1017-1023, 2014;

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3 ed. New York: CRC, 1999;

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade Antioxidante de Frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 2, abril/junho 2008;

MEYER, A.S.; ISAKSEN, A. Application of enzymes as food antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 300–304, 1995;

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v.84, p.407-412, 1993.

MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 1709–1715, 1989;

MONÇÃO, E. C.; SILVA, E. F.; SOUSA, P. B.; SILVA, M. J. M.; SOUSA, M. M. Avaliação físico-química e centesimal de polpas congeladas de cajá (*Spondias mombin* L.) e de manga (*Mangifera indica* L.) consumidas em Teresina-PI. V CONNEPI-2010, 2010;

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição Geográfica de uma Coleção Botânica. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**, v. 1, n.01, p.317, 2014;

NASCIMENTO, V. E. Caracterização de plantas de mamey. Jaboticabal, 2008, 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh – Myrtaceae) of the Brazilian Amazon forest. **Food Research International**, v. 50, p. 70-76, 2013;

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010;

NORO, T.; ODA, Y.; MIYASE, T.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 3984–3987, 1983;

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009;

OLIVEIRA, D. S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R.; PROENÇA, R. P. C.; PINHEIRO-SANT’ANA. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n.1, p. 89-98, 2011;

OLIVEIRA, G. L. S.; JUNIOR, A. L. G.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; FREITAS, R. M. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico da *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, p. 293-300, 2014;

OTTOLENGHI, A. Interaction of ascorbic acid and mitochondria lipids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 79, p. 355, 1959;

OU, B.X.; HUANG, D.J.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50 (11), p. 3122–3128, 2002;

OU, B.; HAMPSCH, M. W.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p.4619 – 26, 2001;

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012;

PEÑARRIETA, J.M.; ALVARADO, J.A.; BERGENSTÅHL, B.; ÅKESSON, B. Spectrophotometric methods for the measurement of total phenolic compounds and total flavonoids in foods. **Revista Boliviana de Química**, v. 24, p. 5-9, 2007;

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3061 – 3067, 2012;

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999;

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC (FL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273–3279, 2003;

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005;

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, vol. 82 (4), p. 513-523, 2011;

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, N.M.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189–207, 2006;

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999;

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008;

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 837–841, 1988;

RODRIGUEZ-MATEOS, A.; VAUZOUR, D.; KRUEGER, C.G.; SHANMUGANAYAGAM, D.; REED, J.; CALANI, L.; MENA, P.; DEL RIO, D.; CROZIER, A. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. **Archives of Toxicology**, v. 88 (10), p. 1803-1853, 2014;

ROESLER, R. Estudo de Frutas do Cerrado Brasileiro para Avaliação de Propriedade Funcional com Foco na Atividade Antioxidante. Campinas, 2007, 208p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia de Alimentos.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 380-384, 2004;

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005;

ROMANO, B.; PAGANO, E.; MONTANARO, V.; FORTUNATO, A. L.; MILIC, N.; BORRELLI, F. Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1588-1596, 2013;

RUCH, R.J., CHENG, S.J., KLAUNIG, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. **Carcinogen**, v. 10, p. 1003-1008, 1989;

RUFINO, M. S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant properties

of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010;

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.G., Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. **Comunicado técnico on line EMBRAPA Agroindústria Tropical**, nº 128, 2007;

SACRAMENTO, C. K.; BARRETTO, W. S.; FARIA, J. C. Araçá-boi: uma alternativa para agroindústria. **Bahia Agrícola**, v. 8, n. 2, 2008;

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654-658, 2009;

SEERAM, N.P.; HENNING, S.M.; LEE, R.; NIU, Y.; SCHEULLER, H.S.; HEBER, D. Catechin and caffeine contents of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 1599–1603, 2006;.

SILVA, J.; SILVA, E. S.; SILVA, P. S. L. Determinação da qualidade e do teor de sólidos solúveis totais nas diferentes partes do fruto da pinheira (*Annona squamosa* L.). **Revista brasileira de fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 562-564, 2002;

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999;

SOLER-RIVAS, C.; ESPIN, J.C.; WICHERS, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 330–338, 2000;

SOUZA, C. M. M.; S, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007;

SPENCER, J. P. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **The British Journal of Nutrition**, v. 104, 2010;

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory evaluation practices,. 3<sup>rd</sup> ed. London,: Academic Press, Inc., 2004. 408p;

TALCOTT, S.T.; PERCIVAL, S.S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit

(*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 935-941, 2003;

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total Phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816-823, 2008;

VIRGINIA, H.; SARAH, L.E.; RACHEL, J.S.; NATHANIEL, T.; JOSEPH, S.; ADAM, E.; CECILIA, G. Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 55, p. 599–603, 2003;

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, 1999, p. 555–559, 1999.

ANEXO 1

TESTE DIFERENÇA DO CONTROLE

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra **padrão (P)** e quatro amostras codificadas de néctar de maçã. Prove a amostra padrão e em seguida prove cada uma das amostras codificadas e avalie na escala abaixo o quanto cada amostra codificada difere, em termos globais, da amostra padrão.

- 0 Nenhuma diferença
- 1
- 2 Ligeiramente diferente
- 3
- 4 Moderadamente diferente
- 5
- 6 Muito diferente
- 7
- 8 Extremamente diferente

Amostra	Grau de diferença
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários:

---

---



## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do projeto:** Avaliação do potencial nutricional, funcional e biotecnológico do extrato de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) para enriquecimento e agregação de valor de bebida com apelo funcional

**Pesquisadores responsáveis:** Tatiana Ferrari Baldini e Dr. Juliano Lemos Bicas

**Número do CAAE:** \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

#### Justificativa e objetivos:

A valorização dos benefícios proporcionados pelas frutas e vegetais amparada por evidências científicas impulsionam o setor industrial a recompor o *portifólio* de produtos que atendam as exigências do mercado consumidor e apontem perspectivas favoráveis para a demanda de frutas *in natura* e processadas, tanto no mercado interno quanto no externo. Desta forma, estudos direcionados para a elucidação do potencial e das propriedades das frutas nativas brasileiras como o araçá-boi, podem trazer subsídios para que ganhem posições no mercado consumidor a médio e longo prazo, bem como maior entendimento da sua atividade para a melhoria da saúde humana. Sendo assim, o objetivo do teste será avaliar se existe diferença sensorial da amostra enriquecida com o extrato da fruta araçá-boi (*Eugenia stipitata*) em três diferentes concentrações em relação ao controle (néctar sem enriquecimento) e o grau dessa diferença. Os resultados irão contribuir para o desenvolvimento de um néctar enriquecido funcional e nutricionalmente.

#### Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a provar 3 amostras de néctar de frutas e 1 amostra Controle e a responder um questionário sobre o grau de diferença de cada amostra em relação ao Controle. Sua participação nas análises será de uma única vez, não sendo necessário retornar ao local para futuras análises. As análises serão realizadas no Laboratório de Análise Sensorial em cabines individuais confortáveis, climatizadas e com iluminação adequada. A identificação do participante será mantida em sigilo pelos pesquisadores.

#### Desconfortos e riscos:

Você não deve participar deste estudo se apresentar algum tipo de alergia ou intolerância a qualquer um dos componentes presentes na formulação dos néctares (acidulante ácido cítrico; aroma natural de maçã; corante natural caramelo; antioxidante ácido ascórbico e espessante goma xantana). Exceto para estes indivíduos, não há riscos previsíveis da participação no projeto.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

**Benefícios:**

Sua participação como voluntário nessa avaliação sensorial contribuirá com o desfecho do projeto de pesquisa que visou à elaboração de um néctar funcional de maçã enriquecido com extrato de araçá-boi.

**Acompanhamento e assistência:**

Em caso de necessidade, nos responsabilizamos por providenciar a intervenção médica ou nutricional no momento ou após a pesquisa por eventuais problemas que venha a apresentar resultante da ingestão do material de pesquisa.

**Sigilo e privacidade:**

Você tem a garantia de que a sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

**Contato:**

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Tatiana Ferrari Baldini; Faculdade de Engenharia de Alimentos/Departamento de Ciência de Alimentos/Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos da Unicamp; telefone (19) 3521-4090; e-mail: thattyfb@gmail.com.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

**Consentimento livre e esclarecido:**

Após ter sido esclarecido sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

**Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

## ANEXO 3

### Teste de aceitação e intenção de compra de néctar de maçã enriquecido com LA

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Por favor, avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou em relação a cada um dos atributos:

**Número da amostra:** \_\_\_\_\_

**Aparência geral**

Desgostei muitíssimo

Gostei muitíssimo

**Cor**

Desgostei muitíssimo

Gostei muitíssimo

**Sabor**

Desgostei muitíssimo

Gostei muitíssimo

**Textura**

Desgostei muitíssimo

Gostei muitíssimo

**Impressão global**

Desgostei muitíssimo

Gostei muitíssimo

**Se esta amostra estivesse à venda, qual seria sua atitude?**

- ( ) Certamente não compraria
- ( ) Provavelmente não compraria
- ( ) Tenho dúvida se compraria ou não
- ( ) Provavelmente compraria
- ( ) Certamente compraria

Cite três principais características do produto: \_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_

## ANEXO 4

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do projeto:** Avaliação do potencial nutricional, funcional e biotecnológico do extrato de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) para enriquecimento e agregação de valor de bebida com apelo funcional

**Pesquisadores responsáveis:** Tatiana Ferrari Baldini e Dr. Juliano Lemos Bicas

**Número do CAAE:** \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

#### **Justificativa e objetivos:**

A valorização dos benefícios proporcionados pelas frutas e vegetais amparada por evidências científicas impulsionam o setor industrial a recompor o *portifólio* de produtos que atendam as exigências do mercado consumidor e apontem perspectivas favoráveis para a demanda de frutas *in natura* e processadas, tanto no mercado interno quanto externo. Desta forma, estudos direcionados para a elucidação do potencial e das propriedades das frutas nativas brasileiras como o araçá-boi, podem trazer subsídios para que ganhem posições no mercado consumidor a médio e longo prazo, bem como maior entendimento da sua atividade para a melhoria da saúde humana. Sendo assim, o objetivo do teste será avaliar a aceitação e a intenção de compra de néctar de maçã enriquecido com extrato da fruta araçá-boi. Os resultados do estudo contribuirão para a produção de um néctar funcional, enriquecido nutricionalmente e com boa aceitação sensorial.

#### **Procedimentos:**

Participando do estudo você está sendo convidado a responder a um questionário sobre hábitos de consumo de néctar de frutas, a provar 6 amostras de néctar de frutas, utilizando uma escala não estruturada de nove pontos e avaliá-los em relação aos parâmetros de: aparência geral, cor, aroma, textura e impressão global. Por fim, será solicitado a avaliá-los quanto à sua intenção de compra. Sua participação nas análises será de uma única vez, não sendo necessário retornar ao local para futuras análises. As análises serão realizadas no Laboratório de Análise Sensorial em cabines individuais confortáveis, climatizadas e com iluminação adequada. A identificação do participante será mantida em sigilo pelos pesquisadores.

#### **Desconfortos e riscos:**

Você não deve participar deste estudo se apresentar algum tipo de alergia ou intolerância a qualquer um dos componentes presentes na formulação dos néctares (acidulante ácido cítrico; aromatizante aroma natural de maçã; corante natural caramelo; antioxidante ácido ascórbico e espessante goma xantana). Exceto para estes indivíduos, não há riscos previsíveis da participação no projeto.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_



**Benefícios:**

Sua participação como voluntário nessa avaliação sensorial contribuirá com o desfecho do projeto de pesquisa que visou à elaboração de um néctar funcional de maçã enriquecido com extrato de arará-boi.

**Acompanhamento e assistência:**

Em caso de necessidade, nos responsabilizamos por providenciar a intervenção médica ou nutricional no momento ou após a pesquisa por eventuais problemas que venha a apresentar resultante da ingestão do material de pesquisa.

**Sigilo e privacidade:**

Você tem a garantia de que a sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

**Contato:**

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Tatiana Ferrari Baldini; Faculdade de Engenharia de Alimentos/Departamento de Ciência de Alimentos/Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos da Unicamp; telefone (19) 3521-4090; e-mail: thattyfb@gmail.com.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

**Consentimento livre e esclarecido:**

Após ter sido esclarecido sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

**Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

**ANEXO 5****COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNICAMP -  
CAMPUS CAMPINAS****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação do Potencial Nutricional, Funcional e Biotecnológico do extrato do araçá-boi (*Eugenia stipitata*) para enriquecimento e agregação de valor de bebida com apelo funcional

**Pesquisador:** Tatiana Ferrari Baldini

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 46904515.1.0000.5404

**Instituição Proponente:** Faculdade de Engenharia de Alimentos

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA EDUCACAO  
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.179.209

**Data da Relatoria:** 10/08/2015

**Apresentação do Projeto:**

A valorização dos benefícios proporcionados pelas frutas e vegetais amparadas por evidências científicas impulsionam o setor industrial a recompor o portfólio de produtos que atendam as exigências do mercado consumidor e apontem perspectivas favoráveis para a demanda de frutas in natura e processadas, tanto no mercado interno quanto externo. Desta forma, estudos direcionados para elucidação do potencial e das propriedades de frutas nativas brasileiras podem trazer subsídios para que ganhem posições no mercado consumidor a médio e longo prazos, bem como maior entendimento de sua atividade para melhoria da saúde humana. Além disso, a preocupação com o meio ambiente incentiva inovações tecnológicas que visem o crescimento da oferta de produtos funcionais certificados pelos órgãos competentes, além de reforçar a relação entre pesquisa acadêmica, desenvolvimento industrial e mercado econômico. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho será avaliar as propriedades antioxidantes e pré-bióticas do extrato de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) para conhecimento de seu potencial, bem como o estudo de sua aplicação como ingrediente funcional para enriquecimento e agregação de valor em bebidas com apelo funcional.

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.179.209

### Objetivo da Pesquisa:

#### Objetivo Primário:

Avaliar as propriedades antioxidantes e pré-bióticas do extrato de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) para conhecimento de seu potencial, bem como estudo de sua aplicação como ingrediente funcional para desenvolvimento de bebidas com apelo funcional.

#### Objetivo Secundário:

- 1) Preparar extrato de polpa de araçá-boi fruta liofilizado.
- 2) Determinar o teor de umidade da polpa e a composição centesimal da polpa.
- 3) Determinar o pH, a acidez total, os teores de sólidos solúveis totais e vitamina C da fruta.
- 4) Quantificar o conteúdo total de taninos e compostos fenólicos.
- 5) Avaliar o potencial antioxidante através dos métodos de DPPH, ABTS e ORAC.
- 6) Analisar por cromatografia (HPLC-DAD) e cromatografia-espectrometria de massas (UPLC ESI-MS/MS) os compostos antioxidantes presentes no extrato de araçá-boi.
- 7) Identificar os principais compostos voláteis presentes nas frutas, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).
- 8) Identificar e quantificar os oligossacarídeos da fruta por HPAEC-PAD.
- 9) Enriquecer um néctar comercial com extrato de araçá-boi e avaliar as características físico-químicas, funcionais e sensoriais.
- 10) Comparar o néctar enriquecido com extrato em relação ao néctar comercial sem enriquecimento.

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

#### Riscos:

O voluntário não deve participar deste estudo se apresentar algum tipo de alergia ou intolerância a qualquer um dos componentes presentes na formulação dos néctares (ácido cítrico; aroma natural de maçã; corante natural caramelo; antioxidante ácido ascórbico e espessante goma xantana). Exceto para estes indivíduos, não há riscos previsíveis da participação no projeto.

#### Benefícios:

A participação dos voluntários nessa avaliação sensorial contribuirá com o desfecho desse projeto de pesquisa que visou à elaboração de um néctar funcional de maçã enriquecido com extrato de araçá-boi.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de Dissertação (Mestrado) de uma aluna, intitulado "Avaliação do Potencial Nutricional, Funcional e Biotecnológico do extrato do araçá-boi (*Eugenia stipitata*) para

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.179.209

enriquecimento e agregação de valor de bebida com apelo funcional", a ser desenvolvido no Departamento de Ciência de Alimentos (DCA)/Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)-Unicamp, sob orientação de um docente dessa Unidade. O projeto está muito bem elaborado, descrevendo em detalhes a metodologia que será utilizada para as análises físico-químicas dos extratos das frutas. É apresentado cronograma (duração de 24 meses) no projeto detalhado, sendo que a revisão bibliográfica, a aquisição das frutas e o preparo dos extratos teve início no 1S2015, mas os testes de avaliação sensorial envolvendo participantes da pesquisa serão realizados no 2S2016. Não é apresentado orçamento, mas a proponente afirma que os recursos serão providos pelo CNPq e pelo Ministério da Educação. Os extratos das frutas serão preparados com a parte comestível das mesmas, liofilizados (para preservar os componentes dos mesmos) e armazenados a -18°C, até o momento da moagem e posteriores análises. Em seguida serão determinados, segundo metodologias analíticas oficiais, já consagradas e aprovadas pela

Associação Analítica de Química-AOAC: Official Methods of Analysis e metodologias relatadas na literatura pertinente: a) teor de umidade; b) composição centesimal; c) identificação dos compostos voláteis; d) acidez total titulável; d) sólidos solúveis totais; e) teor de vitamina C; f) teor de taninos; g) teor de fenóis totais; h) capacidade de sequestrar radicais livres (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)-DPPH; i) captura do radical livre (2,2-azino-bis-(3-etilbezotiazolina)-6-ácido sulfônico)-ABTS; j) capacidade da absorção de radicais oxigênio-ORAC; k) análise dos compostos antioxidantes por HPLC-DAD; l) quantificação dos compostos fenólicos por UPLC ESI-MS/MS; m) identificação e quantificação dos oligossacarídeos presentes na fruta por HPAECPAD.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados a Folha de Rosto, assinada pelo Diretor da FEA, o documento com Informações Básicas do Projeto, o projeto detalhado e 2 termos de Consentimento Livre e Esclarecido, um para cada etapa da pesquisa.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendência: Colocar explicitamente no projeto os Critérios de Inclusão e de Exclusão dos participantes da pesquisa.

Resposta:

Critério de Inclusão:

Pessoas de todas as faixas etárias, de ambos os sexos, que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e que sejam consumidores habituais de néctares de frutas.

Critério de Exclusão:

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



**COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNICAMP -  
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.179.209

Pessoas que possuem qualquer tipo de alergia ou intolerância a qualquer um dos componentes presentes na formulação dos néctares (acidulante ácido cítrico; aroma natural de maçã; corante natural caramelo; antioxidante ácido ascórbico e espessante goma xantana) e/ou que não assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao

<b>Endereço:</b> Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
<b>Bairro:</b> Barão Geraldo	<b>CEP:</b> 13.083-887		
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> CAMPINAS		
<b>Telefone:</b> (19)3521-8936	<b>Fax:</b> (19)3521-7187	<b>E-mail:</b> cep@fcm.unicamp.br	

COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNICAMP -  
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.179.209

protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

CAMPINAS, 11 de Agosto de 2015

---

**Assinado por:**  
**Renata Maria dos Santos Celeghini**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

## ANEXO 6

### Testes Estatísticos pelo programa R

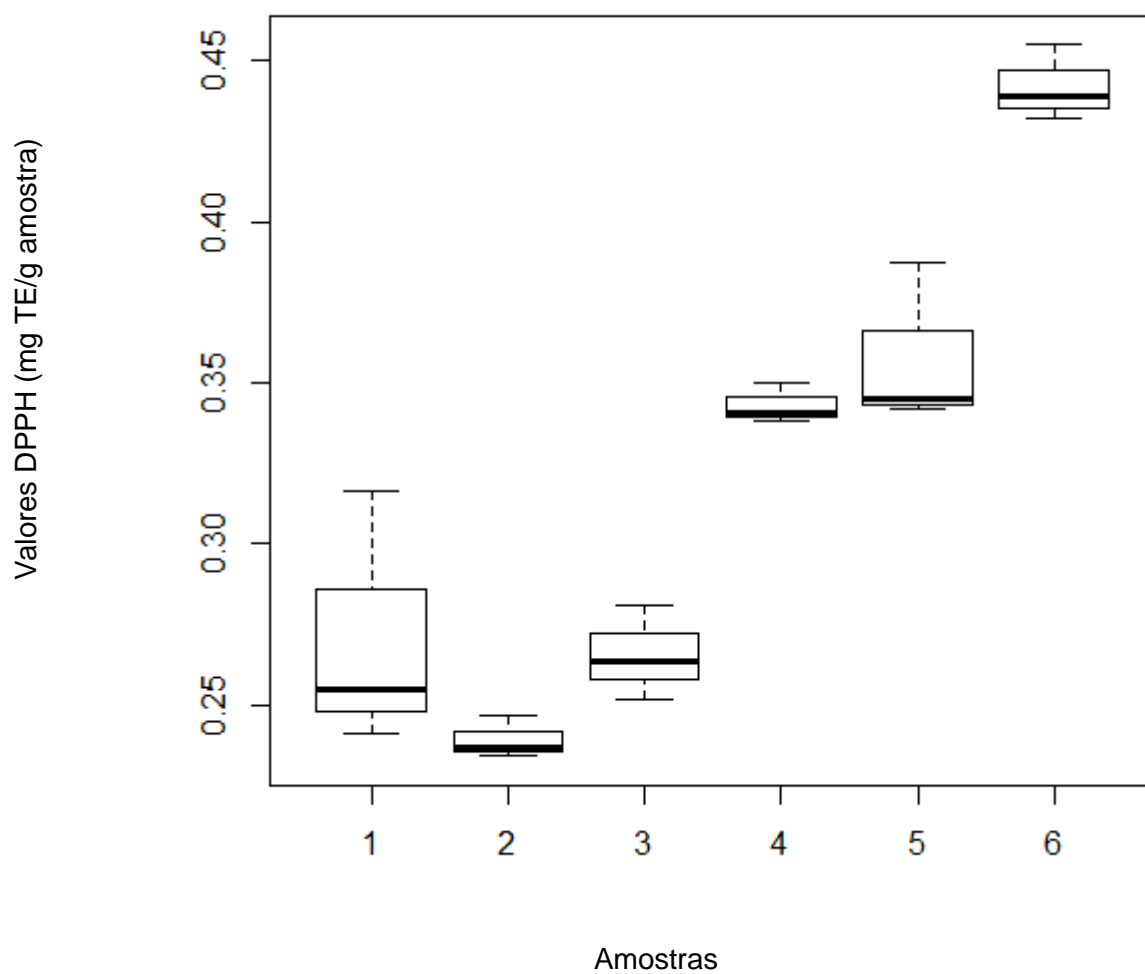
#### *DPPH*

#### Tabela de Análise de Variância (ANOVA)

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>SQM</b>	<b>F</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Concentração	5	0,086305	0,0172610	38,518	5,526e-07***
Resíduo	12	0,005377	0,0004481		

*Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1*

*> boxplot(DPPH\_dados ~ factor(concentr))*

**Medidas DPPH – mediana, valor máximo e mínimo**

\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araquá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araquá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araquá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araquá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araquá-boi liofilizado

```
> TukeyHSD(aov(DPPH_dados ~ factor(concentr)), "factor(concentr)", ordered = TRUE)
```

Comparação múltipla de médias de Tukey

Nível de confiança de 95%

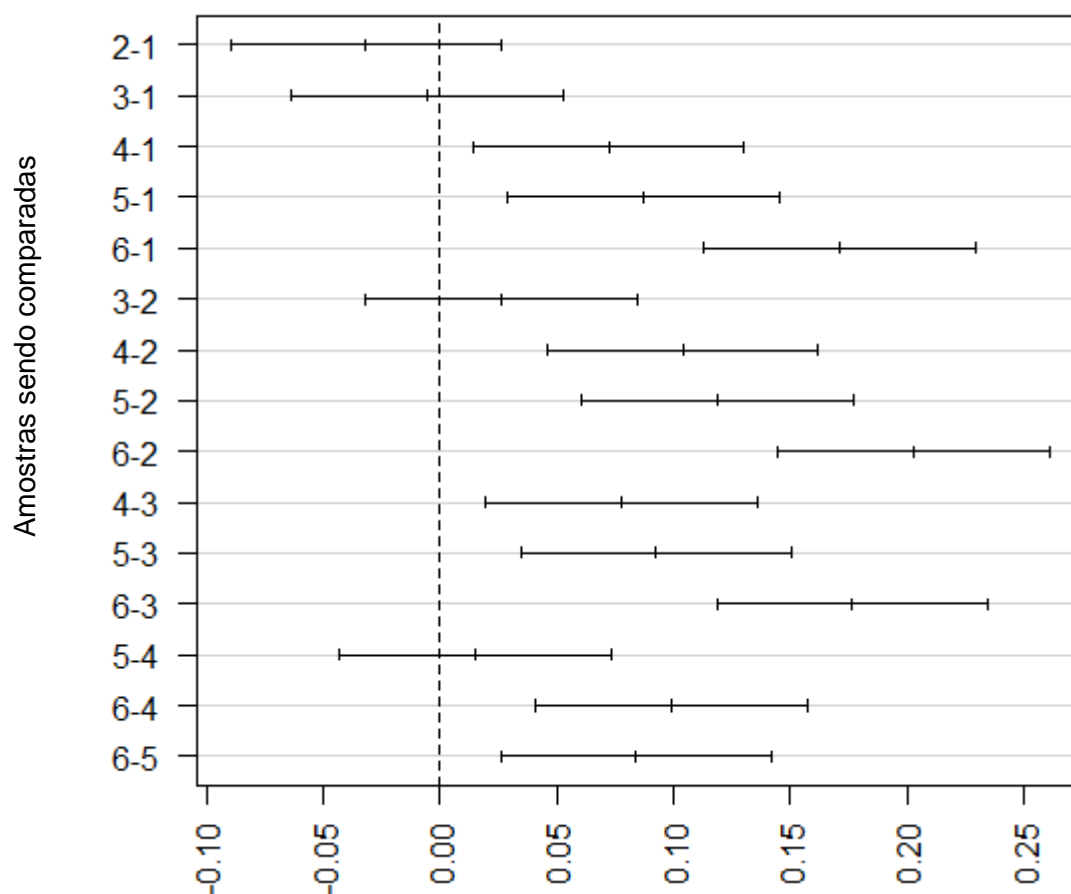
Fit: aov(formula = DPPH\_dados ~ factor(concentr))

\$`factor(concentr)`

Amostras*	Diferença	Limite inferior	Limite superior	Valor - p
3-2	0,026333333	-0,03172344	0,08439011	0,6573330
1-2	0,031800000	-0,02625678	0,08985678	0,4783673
4-2	0,103900000	0,04584322	0,16195678	0,0006702
5-2	0,118833333	0,06077656	0,17689011	0,0001924
6-2	0,202833333	0,14477656	0,26089011	0,0000007
1-3	0,005466667	-0,05259011	0,06352344	0,9994563
4-3	0,077566667	0,01950989	0,13562344	0,0074884
5-3	0,092500000	0,03444322	0,15055678	0,0018464
6-3	0,176500000	0,11844322	0,23455678	0,0000034
4-1	0,072100000	0,01404322	0,13015678	0,0127042
5-1	0,087033333	0,02897656	0,14509011	0,0030558
6-1	0,171033333	0,11297656	0,22909011	0,0000047
5-4	0,014933333	-0,04312344	0,07299011	0,9482599
6-4	0,098933333	0,04087656	0,15699011	0,0010356
6-5	0,084000000	0,02594322	0,14205678	0,0040599

\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado

Gráfico de diferenças em nível de confiança de 95% (Tukey)



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado

## ABTS

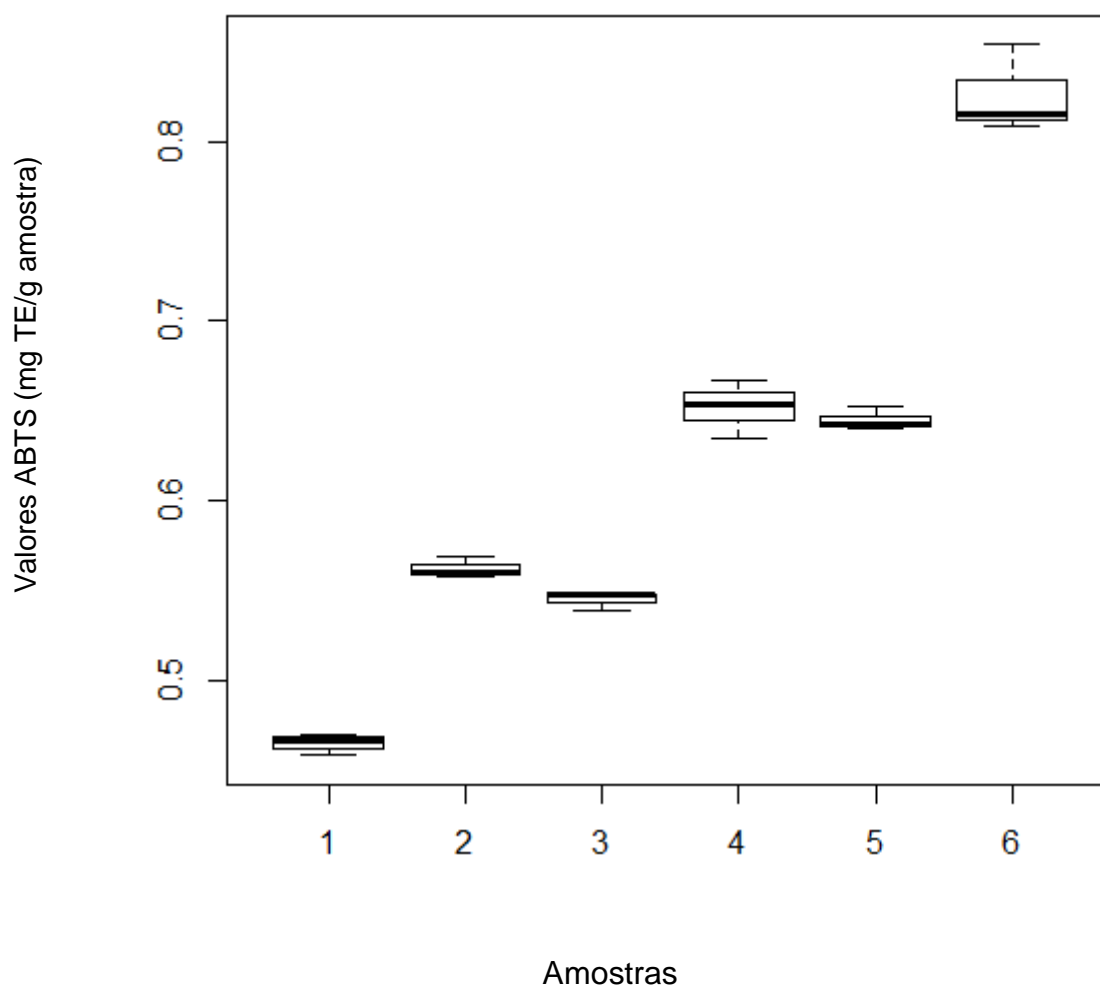
Tabela de Análise de Variância (ANOVA)

	GL	SQ	SQM	F	Pr(>F)
Concentração	5	0,230610	0,046122	278,02	5,7e-12 ***
Resíduo	12	0,001991	0,000166		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> boxplot(ABTS\_dados ~ factor(concentr))

**Medidas ABTS – mediana, valor máximo e mínimo**



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araquá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araquá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araquá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araquá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araquá-boi liofilizado

```
> TukeyHSD(aov(ABTS_dados ~ factor(concentr)), "factor(concentr)", ordered = TRUE)
```

Comparação múltipla de médias de Tukey

Nível de confiança de 95%

```
Fit: aov(formula = ABTS_dados ~ factor(concentr))
```

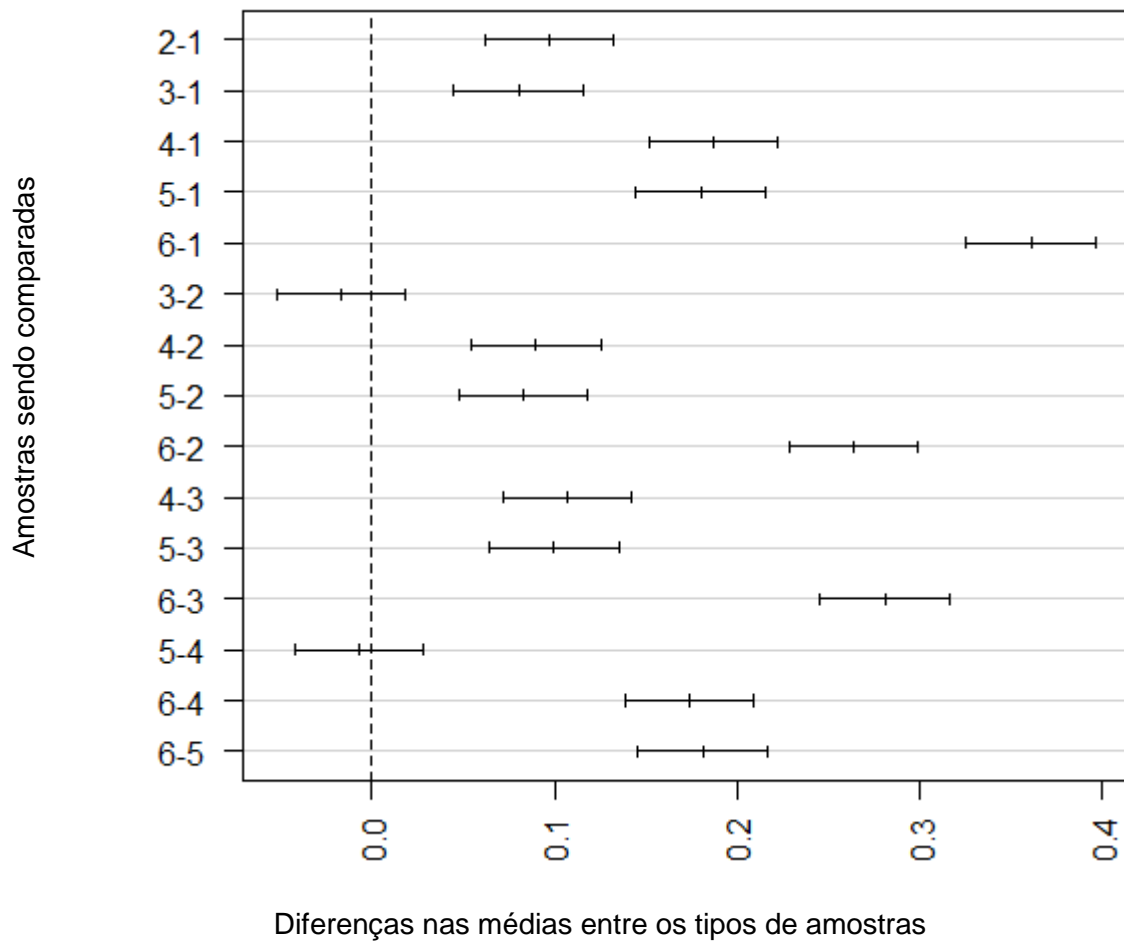
```
$`factor(concentr)`
```

Amostras*	Diferença	Limite inferior	Limite superior	Valor - p
3-1	0,080100000	0,04477569	0,11542431	0,0000708
2-1	0,097266667	0,06194236	0,13259098	0,0000097
5-1	0,179866667	0,14454236	0,21519098	0,0000000
4-1	0,187133333	0,15180902	0,22245764	0,0000000
6-1	0,360800000	0,32547569	0,39612431	0,0000000
2-3	0,017166667	-0,01815764	0,05249098	0,5948438
5-3	0,099766667	0,06444236	0,13509098	0,0000074
4-3	0,107033333	0,07170902	0,14235764	0,0000035
6-3	0,280700000	0,24537569	0,31602431	0,0000000
5-2	0,082600000	0,04727569	0,11792431	0,0000520
4-2	0,089866667	0,05454236	0,12519098	0,0000220
6-2	0,263533333	0,22820902	0,29885764	0,0000000
4-5	0,007266667	-0,02805764	0,04259098	0,9795645
6-5	0,180933333	0,14560902	0,21625764	0,0000000
6-4	0,173666667	0,13834236	0,20899098	0,0000000

\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado



**Gráfico de diferenças em nível de confiança de 95% (Tukey)**



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado

### Fenóis Totais

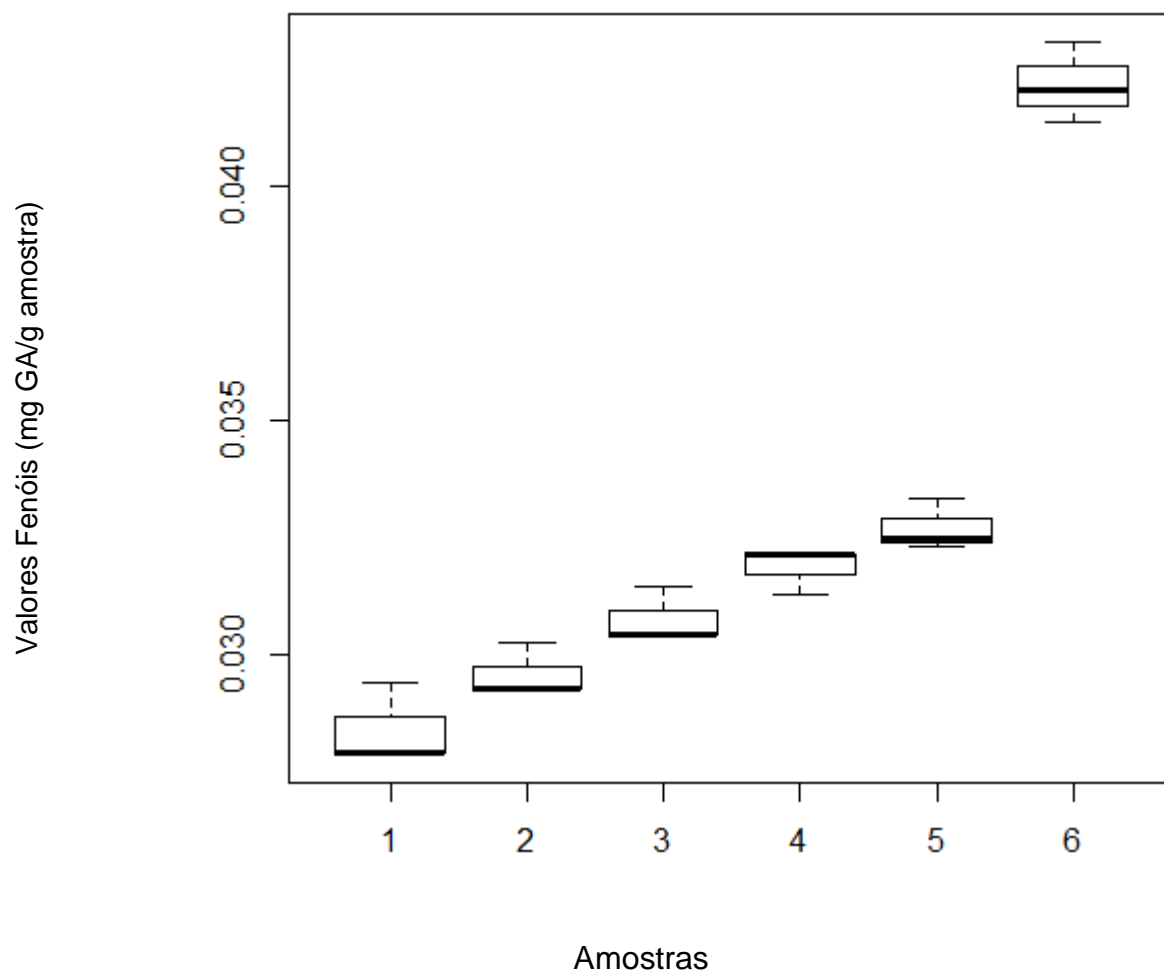
Tabela de Análise de Variância (ANOVA)

	GL	SQ	SQM	F	Pr(>F)
Concentração	5	3,638e-04	7,276e-05	159,01	1,554e-10 ***
Resíduo	12	5,490e-06	4,580e-07		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> boxplot(Fenois_dados ~ factor(concentr))
```

### Medidas ABTS – mediana, valor máximo e mínimo



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado.

> TukeyHSD(aov(Fenois\_dados ~ factor(concentr)), "factor(concentr)", ordered = TRUE)

Comparação múltipla de médias de Tukey

Nível de confiança de 95%

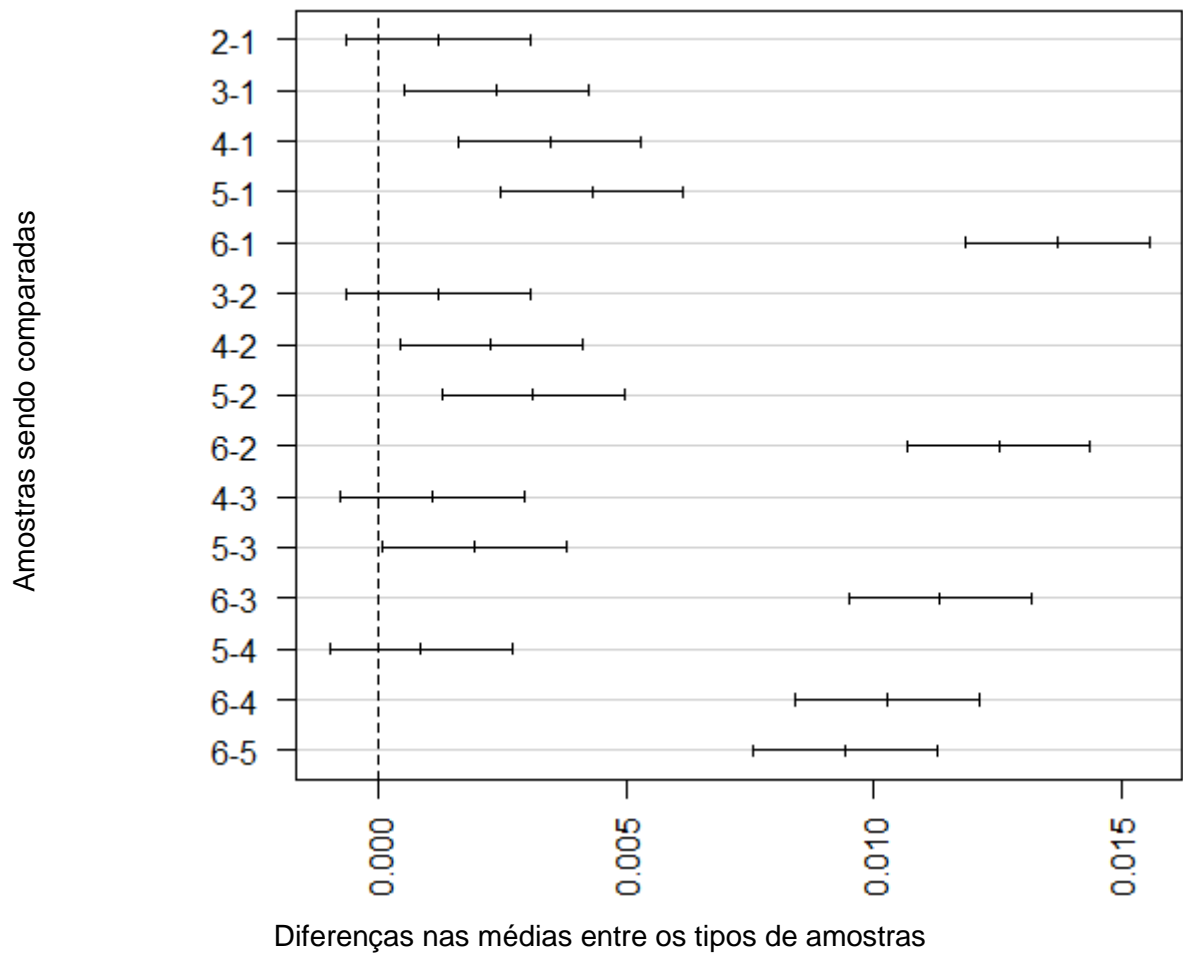
Fit: aov(formula = Fenois\_dados ~ factor(concentr))

\$`factor(concentr)`

Amostras*	Diferença	Limite inferior	Limite superior	Valor - p
2-1	0,001190000	-6,651936e-04	0,003045194	0,3240445
3-1	0,002380000	5,248064e-04	0,004235194	0,0100847
4-1	0,003456667	1,601473e-03	0,005311860	0,0004646
5-1	0,004306667	2,451473e-03	0,006161860	0,0000560
6-1	0,013723333	1,186814e-02	0,015578527	0,0000000
3-2	0,001190000	-6,651936e-04	0,003045194	0,3240445
4-2	0,002266667	4,114730e-04	0,004121860	0,0142314
5-2	0,003116667	1,261473e-03	0,004971860	0,0011728
6-2	0,012533333	1,067814e-02	0,014388527	0,0000000
4-3	0,001076667	-7,785270e-04	0,002931860	0,4208058
5-3	0,001926667	7,147305e-05	0,003781860	0,0402343
6-3	0,011343333	9,488140e-03	0,013198527	0,0000000
5-4	0,000850000	-1,005194e-03	0,002705194	0,6485015
6-4	0,010266667	8,411473e-03	0,012121860	0,0000000
6-5	0,009416667	7,561473e-03	0,011271860	0,0000000

\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado

Gráfico de diferenças em nível de confiança de 95% (Tukey)



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado

## ORAC

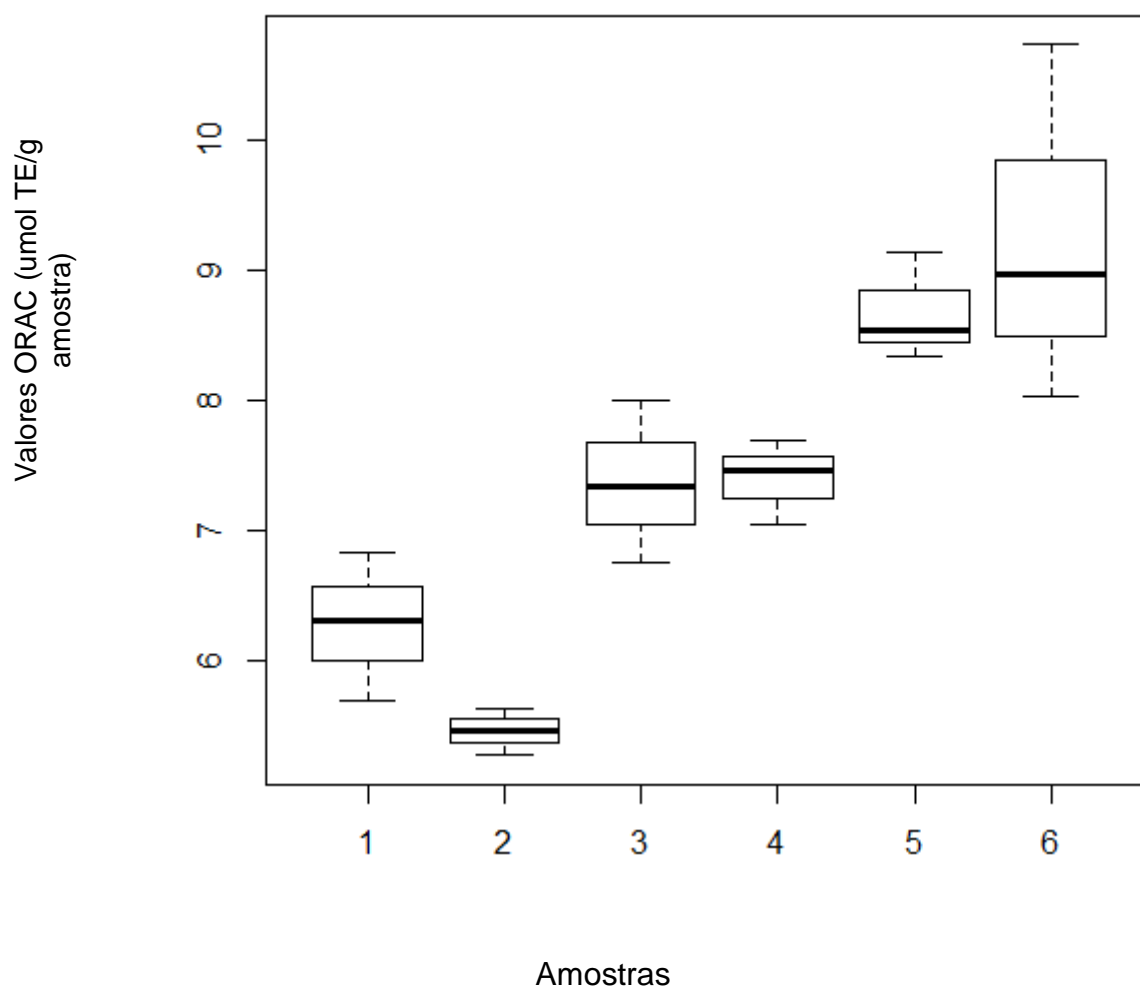
Tabela de Análise de Variância (ANOVA)

	GL	SQ	SQM	F	Pr(>F)
Concentração	5	30,0050	6,0010	12,402	0,0002129 ***
Resíduo	12	5,8065	0,4839		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

boxplot(ORAC\_dados ~ factor(concentr))

## Medidas ORAC – mediana, valor máximo e mínimo



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araquá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araquá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araquá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araquá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araquá-boi liofilizado



*TukeyHSD(aov(ORAC\_dados ~ factor(concentr)), "factor(concentr)", ordered = TRUE)*

Comparação múltipla de médias de Tukey

Nível de confiança de 95%

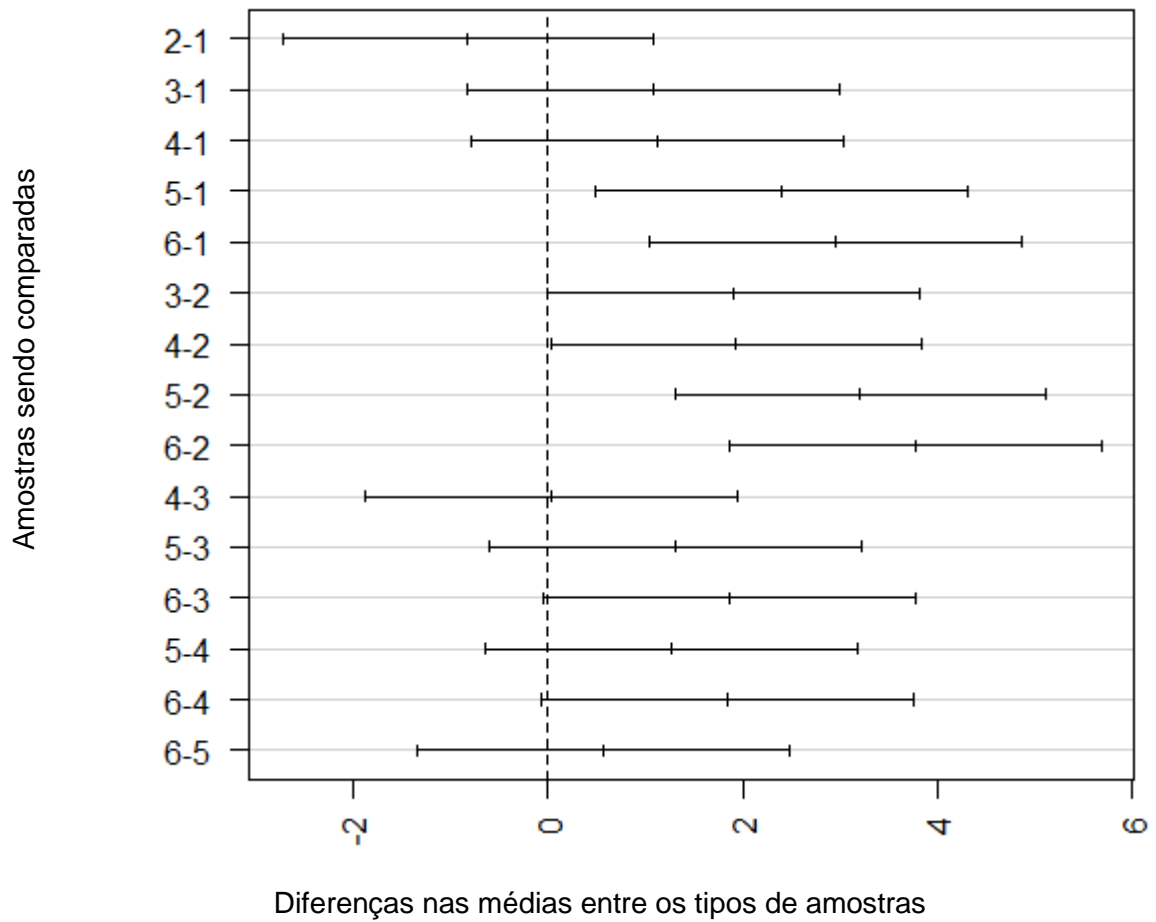
Fit: aov(formula = ORAC\_dados ~ factor(concentr))

\$`factor(concentr)`

Amostras*	Diferença	Limite inferior	Limite superior	Valor - p
1-2	0,8179757	-1,089763300	2,725715	0,7044843
3-2	1,9059183	-0,001820634	3,813657	0,0502691
4-2	1,9361393	0,028400366	3,843878	0,0459791
5-2	3,2100507	1,302311700	5,117790	0,0011567
6-2	3,7743780	1,866639033	5,682117	0,0002658
3-1	1,0879427	-0,819796300	2,995682	0,4381991
4-1	1,1181637	-0,789575300	3,025903	0,4110180
5-1	2,3920750	0,484336033	4,299814	0,0118731
6-1	2,9564023	1,048663366	4,864141	0,0023281
4-3	0,0302210	-1,877517967	1,937960	0,9999999
5-3	1,3041323	-0,603606634	3,211871	0,2668414
6-3	1,8684597	-0,039279300	3,776199	0,0561279
5-4	1,2739113	-0,633827634	3,181650	0,2873896
6-4	1,8382387	-0,069500300	3,745978	0,0613299
6-5	0,5643273	-1,343411634	2,472066	0,9113967

\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado

**Gráfico de diferenças em nível de confiança de 95% (Tukey**



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado



### Flavonoides Totais

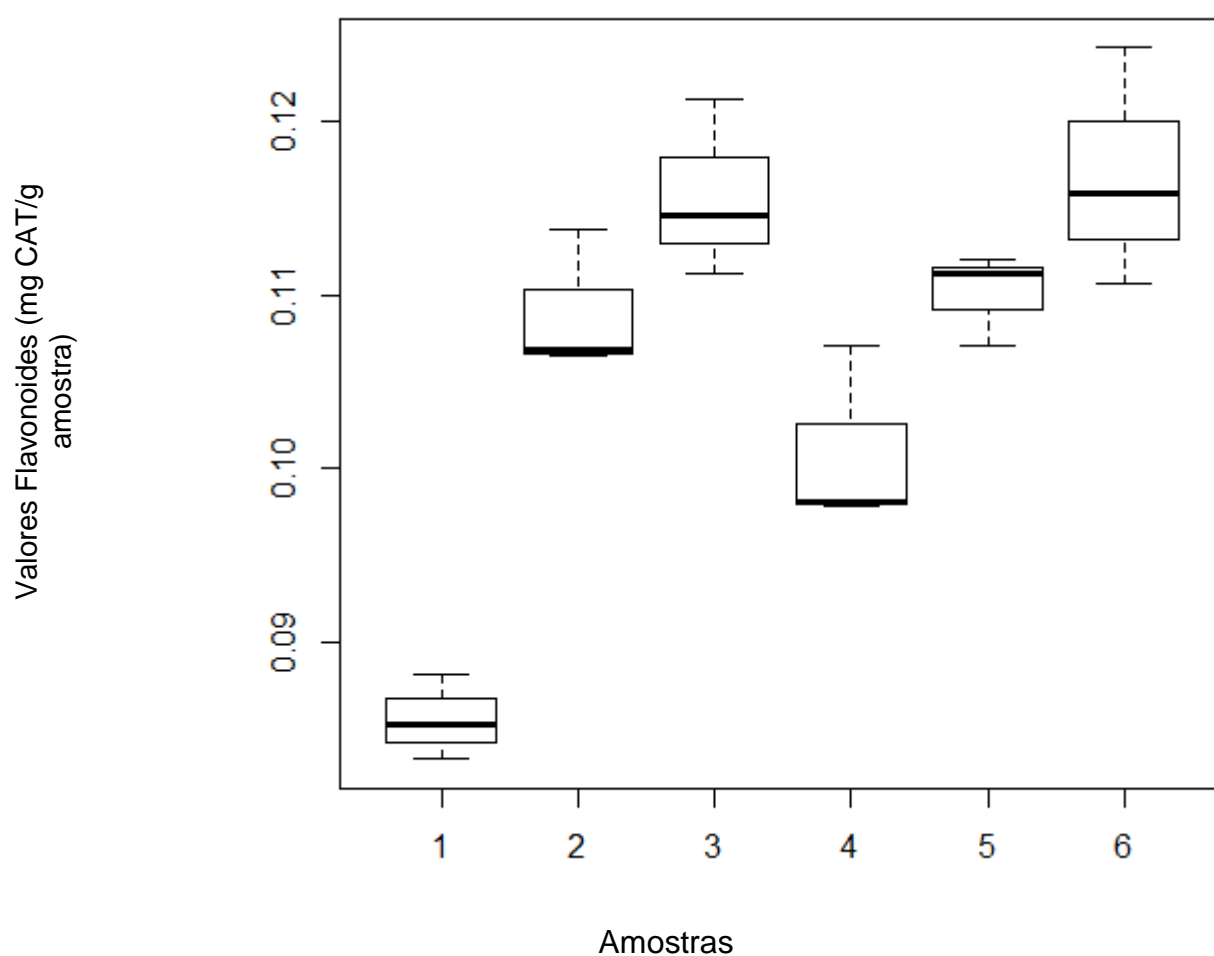
Tabela de Análise de Variância (ANOVA)

	GL	SQ	SQM	F	Pr(>F)
<b>Concentração</b>	5	0,00203175	0,00040635	18,544	2,843e-05 ***
<b>Resíduo</b>	12	0,00026295	0,00002191		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
boxplot(flavonoides_dados ~ factor(concentr))
```

### Medidas ABTS – mediana, valor máximo e mínimo



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araquá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araquá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araquá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araquá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araquá-boi liofilizado

*TukeyHSD(aov(flavonoides\_dados ~ factor(concentr)), "factor(concentr)", ordered = TRUE)*

Comparação múltipla de médias de Tukey

Nível de confiança de 95%

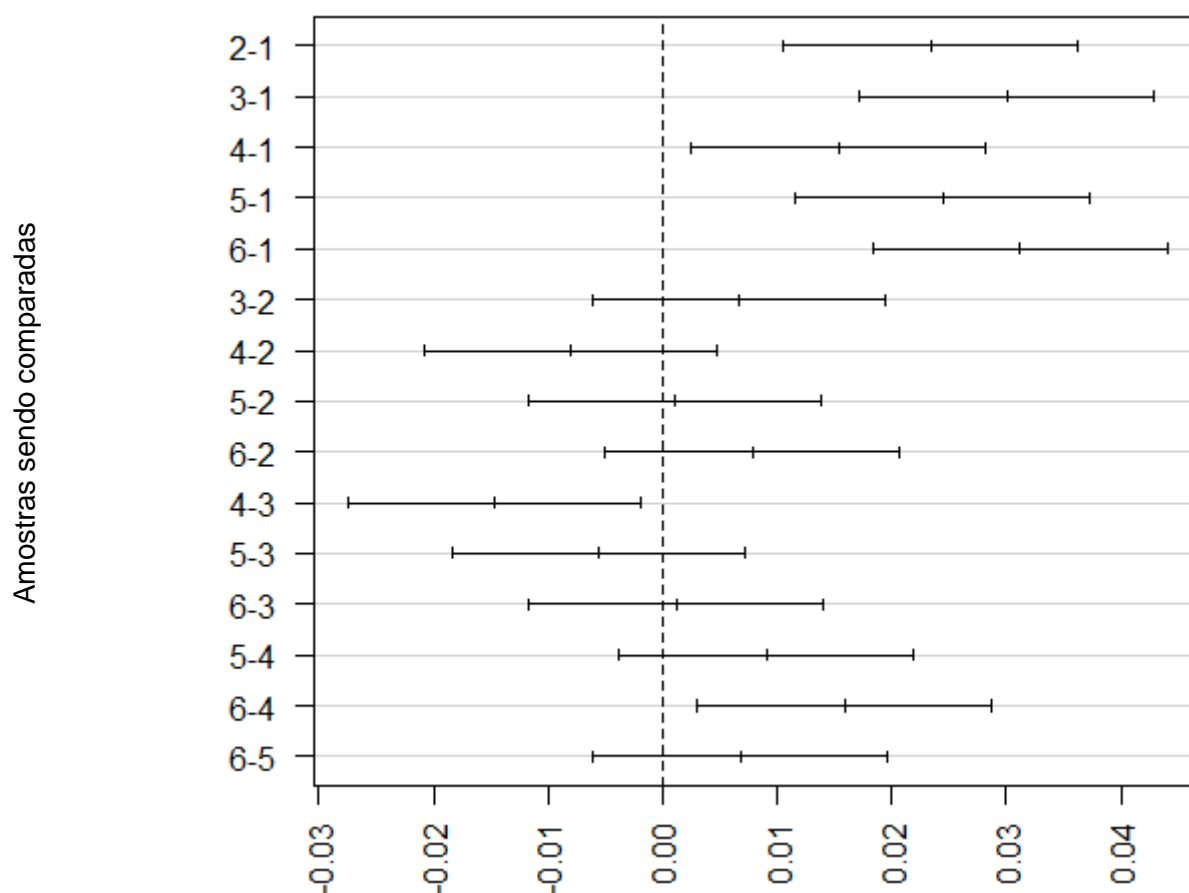
Fit: aov(formula = flavonoides\_dados ~ factor(concentr))

\$`factor(concentr)`

Amostras*	Diferença	Limite inferior	Limite superior	Valor - p
4-1	0,015383333	0,002545189	0,02822148	0,0162601
2-1	0,023406667	0,010568522	0,03624481	0,0005665
5-1	0,024473333	0,011635189	0,03731148	0,0003762
3-1	0,030073333	0,017235189	0,04291148	0,0000511
6-1	0,031240000	0,018401856	0,04407814	0,0000348
2-4	0,008023333	-0,004814811	0,02086148	0,3485847
5-4	0,009090000	-0,003748144	0,02192814	0,2373556
3-4	0,014690000	0,001851856	0,02752814	0,0220888
6-4	0,015856667	0,003018522	0,02869481	0,0131989
5-2	0,001066667	-0,011771478	0,01390481	0,9997042
3-2	0,006666667	-0,006171478	0,01950481	0,5311409
6-2	0,007833333	-0,005004811	0,02067148	0,3716319
3-5	0,005600000	-0,007238144	0,01843814	0,6904813
6-5	0,006766667	-0,006071478	0,01960481	0,5165020
6-3	0,001166667	-0,011671478	0,01400481	0,9995424

\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado

**Gráfico de diferenças em nível de confiança de 95% (Tukey)**



\*1 – Néctar de maçã puro; 2 – Néctar de maçã + 1 g/L de araçá-boi liofilizado; 3 – Néctar de maçã + 5 g/L de araçá-boi liofilizado; 4 – Néctar de maçã + 10 g/L de araçá-boi liofilizado; 5 – Néctar de maçã + 15 g/L de araçá-boi liofilizado; 6 – Néctar de maçã + 30 g/L de araçá-boi liofilizado